

**Elektrochemische Untersuchungen
zum Reaktionsmechanismus des Systems
Folsäure - Dihydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure**

von
Klaus Kretzschmar
aus
Halle/S.

**Elektrochemische Untersuchungen
zum Reaktionsmechanismus des Systems
Folsäure - Dihydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Klaus Kretzschmar

aus

Halle/S.

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.



Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1972

Dekan : Prof. Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatter : Prof. Dr. W. Jaenicke

Zweitberichterstatter : Prof. Dr. H. Kersten

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1968 bis Mai 1972 am Institut für Physikalische Chemie I der Universität Erlangen-Nürnberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Jaenicke ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Jaenicke möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas danken. Seine wertvollen Anregungen und sein immerwährendes Interesse haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. L. Jaenicke, Institut für Biochemie der Universität Köln, für die praktischen Hinweise und anregenden Diskussionen der biochemischen Probleme. Mein Dank gilt ihm außerdem für die zur Verfügung gestellten Vergleichssubstanzen.

Herrn Dr. K.-H. Pauli möchte ich für seine tätige Mithilfe beim Entwurf und dem Aufbau der elektronischen Apparaturen danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen und Symbole	3
1.	Einleitung und Problemstellung	6
2.	Meßmethoden	9
2.1	Polarographie	9
2.2	KALOUSEK-Umschalter	17
2.3	Potentialkontrollierte Elektrolyse	19
2.4	Chronopotentiometrie mit Stromumkehr	20
2.5	Bestimmung des Diffusionskoeffizienten	23
3.	Experimentelles	25
3.1	Herstellung von 7,8-Dihydrofolsäure	25
3.2	Herstellung von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure ..	26
3.3	Zusammensetzung und Vorbehandlung der Versuchslösungen	27
3.4	Polarographische Zelle und Meßanordnung	29
3.5	Anordnung für die Elektrolyse bei konstantem Potential	29
3.6	Messungen am hängenden Quecksilbertropfen ..	31
3.7	Messung des Diffusionskoeffizienten	33
4.	Meßergebnisse und ihre Diskussion	35
4.1	Polarographische Untersuchungen	35
4.1.1	Reduktion von Folsäure	37
4.1.2	Reduktion von 7,8-Dihydrofolsäure	40
4.1.3	Oxidation von Tetrahydrofolsäure	40
4.1.4	Abhängigkeit von der Behälterhöhe und Rever- sibilität bei den polarographischen Stufen	41
4.2	Potentialkontrollierte Reduktion von Folsäure	45
4.2.1	Reduktion im pH-Bereich zwischen 5 und 7 ...	45
4.2.2	Reduktion bei pH 9	50
4.3	Potentialkontrollierte Oxidation von Tetrahydrofolsäure	51
4.3.1	Oxidation im pH-Bereich zwischen 5 und 7 ...	51
4.3.2	Oxidation bei pH 9	54

4.4	Geschwindigkeitskonstanten der chemischen Folgereaktionen an Hand chronopotentiometrischer Messungen	56
4.4.1	Reduktion von Folsäure	57
4.4.2	Reduktion von 7,8-Dihydrofolsäure	59
4.4.3	Oxidation von Tetrahydrofolsäure	59
4.5	Orientierende Versuche zur Komplexbildung	60
5.	Zusammenfassung	62
	Literatur	65
A	Anhang	A 1
A 1.	Apparatur zur Polarographie und potential-kontrollierten Elektrolyse	A 2
A 1.1	Verwendung der Apparatur zur potential-kontrollierten Elektrolyse	A 4
A 1.2	Verwendung der Apparatur zur Polarographie	A 6
A 2.	Apparatur zur Chronopotentiometrie mit Stromumkehr	A 6
A 3.	Schaltbild und Arbeitsweise des KALOUSEK-Umschalters	A10

Abkürzungen und Symbole

a	Aktivität
A	elektrische Arbeit
c	Konzentration
c_0	Konzentration vor der Elektrode
C	Konzentration im Lösungsinnern
D	Diffusionskoeffizient
e	Elektron
E	Elektrodenpotential
E_0	Standardpotential
$E_{1/2}$	Halbwellenpotential
f	Aktivitätskoeffizient
F	FARADAY-Konstante
h	Quecksilberniveauhöhe
i	Stromdichte
$\bar{I}$	mittlere Stromstärke
$\bar{I}_a$	mittlerer Adsorptionsstrom
$\bar{I}_d$	mittlerer kathodischer Diffusionsgrenzstrom
$\bar{I}_{irr}$	mittlere Stromstärke bei irreversibler Durchtrittsreaktion
$\bar{I}_k$	mittlerer kinetischer Strom
$\bar{I}_d$	mittlerer anodischer Diffusionsgrenzstrom
j	$i_1/(i_1 + i_2)$
J	Teilchenstrom dn/dt
k	Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Folge- reaktion

k_e	Geschwindigkeitskonstante der Durchtrittsreaktion
K	Semichinonbildungskonstante
K_i	Dissoziationskonstante
K_z	Zellenkonstante
m	Anzahl der umgesetzten Wasserstoffionen
$\dot{m}$	Ausströmungsgeschwindigkeit dm/dt
n	Anzahl der Elektronen pro Durchtrittsreaktion
Ox	oxidierte Depolarisatorform
Q	Querschnitt
r_o	Tropfenradius
R	Gaskonstante
Red	reduzierte Depolarisatorform
S	Semichinon
t	Zeit
t_1	Impulslänge
T	absolute Temperatur
V	Volumen
x	Abstand von der Elektrodenoberfläche
y	Stärke der Glasfritte
α	Durchtrittsfaktor
Γ	maximal adsorbierbare Molzahl pro cm^2
$\Delta\psi$	Galvanispannung zwischen Elektrode und Lösung
μ	Reaktionsschichtdicke
τ	Tropfzeit
τ_i	Transitionszeit
θ	$(t_1 + \tau_2)/\tau_2$

F	Folsäure
FH ₂	Dihydrofolsäure
FH ₄	Tetrahydrofolsäure
6-MePtH ₂	6-Methyl-7,8-dihydropterin
6-MePtH ₄	6-Methyltetrahydropterin
6-OHPt	Xanthopterin
6-OHPtH ₂	Dihydroxanthopterin
Pterin (Pt)	2-Amino-4-hydroxypteridin
SCE	gesättigte Kalomelelektrode

1. Einleitung und Problemstellung

Elektrochemische Methoden lassen sich zur Untersuchung organischer Verbindungen heranziehen, wenn diese im Potentialbereich der Elektrode oxidierbar oder reduzierbar sind. Dieser Bereich ist durch die anodische Auflösung des Elektrodenmaterials und die kathodische Wasserstoffabscheidung bzw. die Reduktion des Leitsalzes begrenzt. Der Reaktionsmechanismus einer Substanz während der Oxidation oder der Reduktion vor einer Elektrode läßt sich aus der Analyse des Elektrodenprozesses entnehmen. Alle Informationen über Kinetik und Mechanismus des zu untersuchenden Systems erhält man bei gegebenen Randbedingungen aus Zusammenhängen zwischen Konzentration, Strom, Spannung und Zeit.

Zu den elektrochemisch aktiven, auch biochemisch interessanten Systemen gehören die Pteridine. Allen ist ein heterocyclisches Ringsystem gemeinsam, welches aus einem Pyrimidin- und einem Pyrazinring besteht. 2-Amino-4-hydroxypteridin wird auch kurz als Pterin bezeichnet. Durch Substitution der 6-Stellung mit dem N-Methyl-p-aminobenzoylglutaminsäurerest erhält man Folsäure (Pteroylglutaminsäure). Diese läßt sich auf chemischen Wege stufenweise bis zur 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure reduzieren. Dabei wird nur der Pyrazinring angegriffen. Formal existieren fünf verschiedene Dihydroisomere: 5,6-, 6,7-, 5,8-, 7,8- und eine p-chinoide Dihydrofolsäure. Ihre Strukturformeln und die

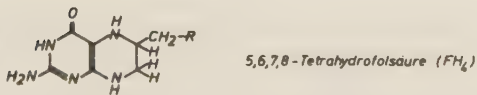
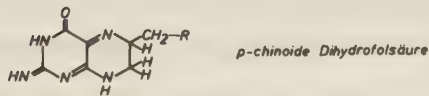
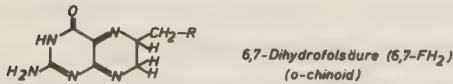
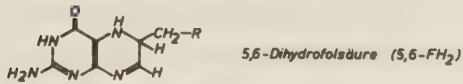
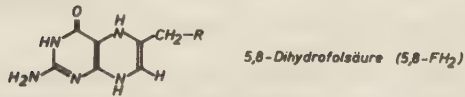
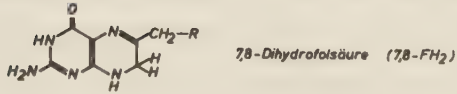
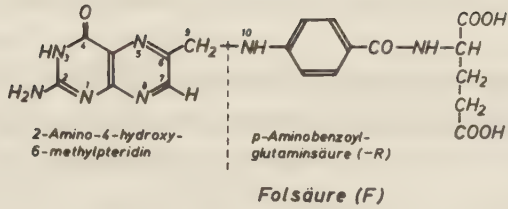


Abb. 1

Nomenklatur sind aus Abbildung 1 ersichtlich.

Unter physiologischen Bedingungen übertragen Tetrahydrofolsäurederivate Einkohlenstoff-Einheiten¹. Andere Tetrahydropterine besitzen Cofaktoreigenschaften. Die Untersuchungen auf dem Pteringegebiet verstärkten sich daher begreiflicherweise, als von S. KAUFMAN die Mitwirkung eines Tetrahydropterins als Coenzym bei der Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin erkannt wurde². In Modellversuchen wurde festgestellt, daß hierbei auch Tetrahydrofolsäure enzymatische Aktivität zeigt³.

Bei der Vielzahl der Isomeren im System Folsäure - Dihydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure lassen eingehende elektrochemische Untersuchungen interessante Ergebnisse erwarten. Es liegen schon einige Publikationen vor, die sich mit der Polarographie von Folsäure allein, bzw. verschiedenen substituierten Pterinen beschäftigen⁴⁻⁸. Die Oxidation von Tetrahydropterinen ist außerdem mit analytisch-chemischen und spektroskopischen Methoden untersucht worden. Dabei sind verschiedene Reaktionsmechanismen postuliert worden⁹⁻¹³.

Ziel dieser Arbeit war es, den gesamten Reaktionsmechanismus des Systems Folsäure - Dihydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure mit elektrochemischen Methoden aufzuklären. Dazu sollten die Polarographie, die potentialkontrollierte Elektrolyse und die Chronopotentiometrie mit Stromumkehr herangezogen werden.

Diese Methoden erlauben es, stabile und instabile Reaktionsprodukte aufzufinden und auch Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Zur Identifikation der Zwischen- und Endprodukte sollten weitere, insbesondere spektroskopische Methoden benutzt werden.

2. Meßmethoden

2.1 Polarographie

In der Polarographie werden Elektrodenprozesse an einer ideal polarisierbaren Quecksilbertropfelektrode als Arbeitselektrode untersucht. Die Gegenelektrode ist unpolarisierbar und meist eine gesättigte Kalomelelektrode. Der gesamte Elektrodenvorgang besteht aus Oxidation oder Reduktion elektroaktiver Substanzen (Depolarisatoren). Teilprozesse sind im einfachsten Fall reiner Elektronenübertragung Hindiffusion zur Elektrode, Durchtrittsreaktion und Rückdiffusion in die Lösung. Befindet sich ein genügend großer Leitsalzüberschuß in der Untersuchungslösung, wird der Depolarisator nur durch Diffusion und nicht durch das elektrische Feld transportiert. Ist die Diffusion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, gilt für die Tropfelektrode die ILKOVIC-Gleichung¹⁴. Für den über die Tropfzeit τ gemittelten Diffusionsstrom $\bar{I}$ erhält man:

$$\bar{I} = a^* n F D^{1/2} \pi^{2/3} \tau^{1/6} (C - c_0), \quad (1)$$

wobei n die Anzahl der Elektronen pro Durchtrittsreaktion, F die FARADAY-Konstante, D den Diffusionskoeffizienten des Depolarisators, $\dot{m}$ die Ausflußgeschwindigkeit des Quecksilbers, C die Konzentration im Lösungsinnern und c_0 die Konzentration vor der Elektrodenoberfläche bedeuten. Die Konstante a^* besitzt den Wert $0,627 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2/3} \text{ Mol}^{-1}$. Für die exakte Berechnung des Diffusionsstromes ist die sphärische Diffusion zur Elektrode zu berücksichtigen¹⁵. Normalerweise wird auf diese Korrektur verzichtet, da die Experimente in guter Übereinstimmung mit Gl. (1) stehen. Zur Beschreibung der polarographischen Strom-Spannungskurve wird außer der ILKOVIC-Gleichung eine Beziehung zwischen Konzentration und Potential benötigt. Für den reversiblen Fall (geschwindigkeitsbestimmende Diffusion) ist dies die NERNST'sche Gleichung:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln (a_{\text{ox}}/a_{\text{red}})_{x=0} , \quad (2)$$

wobei E das Elektrodenpotential, E_0 das Standardpotential des Redoxsystems, R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, a_{ox} und a_{red} die Aktivitäten der oxidierten bzw. reduzierten Depolarisatorform und x den Abstand von der Elektrodenoberfläche bezeichnen. Aus Gl. (1) und Gl. (2) folgt bei gleichzeitiger Anwesenheit des Depolarisators in seiner oxidierten und reduzierten Form:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{ox}}{f_{red}} \sqrt{\frac{D_{red}}{D_{ox}}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I - \bar{I}_d} \quad (3)$$

mit der Bezeichnung f für den Aktivitätskoeffizienten, $\bar{I}_d$ für den mittleren kathodischen und $\bar{I}_d$ für den mittleren anodischen Grenzstrom. Die Indizes "ox" und "red" beziehen sich auf die oxidierte bzw. reduzierte Depolarisatorform. Da das letzte Glied in Gl. (3) bei $\bar{I} = (\bar{I}_d + \bar{I}_d)/2$ verschwindet, folgt für das "Halbwellenpotential" im vorliegenden Fall:

$$E_{1/2} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{ox}}{f_{red}} \sqrt{\frac{D_{red}}{D_{ox}}} \quad (4)$$

Dieses wird in der Praxis meist auf die gesättigte Kalomелеlektrode bezogen. Zur Umrechnung auf Normalbedingungen ist E_H^0 (Kalomel, gesättigt) = 0,2412 V zu addieren¹⁶. Unter der Annahme, daß die Aktivitätskoeffizienten $f = 1$, und die Diffusionskoeffizienten gleich groß sind,

$D_{ox} = D_{red}$, ist $E_{1/2} = E_0$, und man erhält für den einfachen Fall einer Reduktion als polarographische Strom-Spannungskurve, falls $a_{red} = 0$:

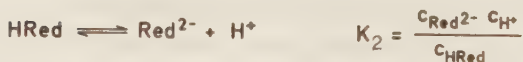
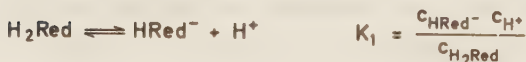
$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I} \quad (5)$$

Gl. (5) genügt meist den experimentellen Anforderungen.

Bei der Untersuchung von Systemen mit unbekanntem Verhalten während des Elektrodenprozesses kann man nicht nur mit den oben erwähnten drei Elementarschritten rechnen.

Vorgelagerte Reaktionen, Adsorptionseffekte, Umlagerungen, Disproportionierungen, mögliche intermediäre Radikalbildung, nachgelagerte Reaktionen, sowie Komplexbildungen beeinflussen die stationäre Konzentration im Elektrodenraum und damit die Transportbedingungen. Außerdem kann die Durchtrittsreaktion langsam gegenüber der Diffusion verlaufen. Dann kommt es zu teilweise oder total irreversiblen Stufen.

Unterliegen organische Verbindungen einem Elektrodenprozeß, so ist die Reduktion oder Oxidation mit einer Aufnahme oder Abgabe von Protonen verbunden, z.B. gemäß dem Gleichungssystem:



Damit ergibt sich eine pH-Abhängigkeit des Halbstufenpotentials. Verallgemeinert lassen sich Protonen als die einfachsten Komplexbildner auffassen. Bilden sich während des Elektrodenprozesses Komplexe, oder wird ein Komplex oxidiert oder reduziert, ändert sich das Halbwellenpotential in charakteristischer Weise. Wenn eine Dissoziation eines oder mehrerer Reaktionsteilnehmer möglich ist, gehen außerdem die Dissoziationskonstanten K_i in die Gl. (3) bzw. Gl. (4) ein. Für den oben genannten Fall, daß

nur das Reaktionsprodukt Red^{2-} dissoziiert, erhält man für das Halbwellenpotential Gl. (6):

$$E_{1/2} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{\text{ox}}}{f_{\text{red}}} \sqrt{\frac{D_{\text{red}}}{D_{\text{ox}}}} - \frac{RT}{nF} \ln K_1 K_2 + \frac{RT}{nF} \ln [K_1 K_2 + K_1 c_{\text{H}^+} + c_{\text{H}^+}^2] \quad (6)$$

Ist $c_{\text{H}^+}^2 \gg (K_1 c_{\text{H}^+} + K_1 K_2)$; gilt:

$$E_{1/2} = E_0^* + \frac{RT}{nF} \ln c_{\text{H}^+}^2 \quad (7)$$

mit

$$E_0^* = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{\text{ox}}}{f_{\text{red}}} \sqrt{\frac{D_{\text{red}}}{D_{\text{ox}}}} - \frac{RT}{nF} \ln K_1 K_2$$

Handelt es sich um eine m-stufige Dissoziation, folgt aus Gl. (7):

$$E_{1/2} = E_0^{**} - \frac{2,3mRT}{nF} \text{pH} \quad (8)$$

wobei

$$E_0^{**} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{\text{ox}}}{f_{\text{red}}} \sqrt{\frac{D_{\text{red}}}{D_{\text{ox}}}} - \frac{RT}{nF} \ln \prod_{i=1}^m K_i$$

Gl. (3) läßt sich linearisieren, wenn $\lg \frac{I_d - I}{I - I_d}$ gegen E aufgetragen wird. Aus der Steigung dieser Geraden ("logarithmische Analyse") ergibt sich die Anzahl n der Elektronen pro Durchtrittsreaktion. Die $E_{1/2}/\text{pH}$ -Kurve gemäß Gl. (8) weist eine Steigung auf, die den Quotienten m/n proportional ist.

Bei Gültigkeit der ILKOVIC-Gleichung (Gl. 1) muß der Grenzstrom der Depolarisatorkonzentration direkt propor-

tional sein. Damit läßt sich entweder der Diffusionskoeffizient D oder wiederum die Anzahl n der Elektronen pro Durchtrittsreaktion bestimmen. Eine vorgelagerte kinetische Reaktion, sowie katalytische und Adsorptionsvorgänge beeinflussen den Grenzstrom. Eine Entscheidung, ob es sich um einen reinen Diffusionsgrenzstrom handelt, ist dadurch möglich, daß man die Abhängigkeit des Grenzstromes von der Quecksilberniveauhöhe h beobachtet. Untersucht man die Gleichungen für die einzelnen Fälle, so erhält man verschiedene Zusammenhänge zwischen Grenzstrom und Quecksilberniveauhöhe. So gilt für den Adsorptionsgrenzstrom¹⁷ I_a :

$$I_a = \text{const.} \cdot \Gamma \cdot n \cdot F \cdot \bar{h}^{2/3} \cdot \tau^{-1/3} \quad (9)$$

und für den Grenzstrom bei vorgelagerter Reaktion¹⁸ I_k :

$$I_k = \text{const.}' \cdot \bar{h}^{2/3} \cdot \tau^{2/3} \cdot n \cdot F \cdot \mu \cdot k \cdot C, \quad (10)$$

wobei die Konstante in Gl. (9) den Wert $\text{const.} = 0,85 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2/3} \text{ Mol}^{-1}$ besitzt, und Γ die maximal adsorbierbare Molzahl pro Oberflächeneinheit bedeutet. In Gl. (10) hat die Konstante den Wert $\text{const.}' = 0,51 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2/3} \text{ Mol}^{-1}$, k bezeichnet die Geschwindigkeitskonstante der vorgelagerten Reaktion erster Ordnung, bei welcher die elektroaktive Depolarisatorform gebildet wird. Diese hat eine mittlere Lebensdauer t' , die der Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion k' umgekehrt proportional ist. Damit ergibt sich die Reaktionsschichtdicke zu $\mu = \sqrt{D/k'}$. Man erhält aus den Proportionalitäten: $h \sim \bar{h}$ und $h \sim 1/\tau$ für den

- a) Diffusionsgrenzstrom $\bar{I}_d \sim h^{1/2}$
- b) Adsorption'sgrenzstrom $\bar{I}_a \sim h$ (11)
- c) kinetischen Grenzstrom $\bar{I}_k$ unabhängig von h.

Bei gehemmter Durchtrittsreaktion wird die Steigung der polarographischen Welle flacher. In Abwesenheit von Adsorption oder kinetischen Komplikationen bleibt hier jedoch der Grenzstrom gleich dem Diffusionsgrenzstrom.

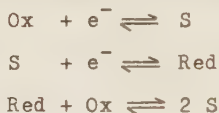
Die Theorie der Durchtrittsüberspannung beruht auf der Erhöhung oder Erniedrigung der Aktivierungsenergie durch das Feld an der Elektrodenoberfläche, also der angelegten Spannung. Der Effekt wird durch den Durchtrittsfaktor α beschrieben, der zwischen 0 und 1, praktisch zwischen 0,3 und 0,7, liegen kann und den Bruchteil der elektrischen Arbeit $A = nF\Delta\phi$ angibt, um welchen sich die Aktivierungsenergie ändert. $\Delta\phi$ ist die Potentialdifferenz zwischen Arbeitselektrode und Lösung. Am einfachsten ist der total irreversible Fall, d.h. eine einseitig ablaufende Durchtrittsreaktion, zu behandeln. So ergibt sich z.B. für eine kathodische Reduktion an der Quecksilbertropfelektrode¹⁹:

$$\frac{\bar{I}_{irr}}{\bar{I}_d - \bar{I}_{irr}} = \text{const.} \cdot k_e \sqrt{\frac{\tau}{D_{ox}}} \exp \left[- \frac{\alpha n F (E - E_0)}{RT} \right], \quad (12)$$

wobei k_e (in cms^{-1}) die Geschwindigkeitskonstante der Durchtrittsreaktion bei $E = E_0$ bezeichnet, und der Index "irr" sich auf die Irreversibilität bezieht. Die dimen-

sionslose Konstante const." hat den Wert 0,886. Die logarithmische Analyse von Gl. (12) liefert aus der Steigung das Produkt αn ; die Bestimmung der Anzahl n der Elektronen pro Durchtrittsreaktion ist auf diese Weise nicht mehr eindeutig.

Ein wichtiger Fall sind mehrfache Durchtrittsprozesse, z. B. die Bildung von Radikalen (Semichinonbildung):



Mit der Bildungskonstanten K des Semichinons S

$$K = \frac{c_s^2}{c_{\text{ox}} c_{\text{red}}}$$

läßt sich die zum genannten Reaktionssystem gehörige Strom-Spannungskurve wie folgt darstellen²⁰:

$$E = E_0 + \frac{RT}{2F} \ln \frac{\bar{i}_d - \bar{i}}{\bar{i}} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{\sqrt{(2\bar{i} - \bar{i}_d)^2(K-4) + 4\bar{i}_d^2} + (2\bar{i} - \bar{i}_d) \sqrt{K}}{\sqrt{(2\bar{i} - \bar{i}_d)^2(K-4) + 4\bar{i}_d^2} - (2\bar{i} - \bar{i}_d) \sqrt{K}} \quad (13)$$

Die Bildungskonstante K kann Werte zwischen 0 und ∞ annehmen. Bei $K = 0$ entfällt der dritte Term in Gl. (13). Man erhält den Ausdruck für einen normalen Zweielektrodenprozeß; vgl. Gl. (5). Das Halbwellenpotential wird nicht verändert, wohl aber wiederum die Steilheit der Kurve. Ein spezieller Fall liegt vor, wenn $K = 4$ ist. Aus Gl. (13) folgt dann:

$$E = E_0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{\bar{I}_d - \bar{I}}{\bar{I}} \quad (14)$$

und $d\ln\bar{I}/dE$ ist nur noch halb so groß, wie bei einem reinen diffusionsbegrenzten Vorgang (Gl. 5). Unter diesen Umständen wird für eine reversible Zweielektronenreaktion die Steigung einer Einelektronenreaktion erhalten. Wie bei der gehemmten Durchtrittsreaktion läßt sich auch hier n nicht aus dem Polarogramm entnehmen. Nimmt K größere Werte als 20 an, trennt sich die Stufe in zwei Teile, wobei jeder einer Einelektronenreaktion entspricht. Beide Teilkurven liegen symmetrisch zum mittleren Wendepunkt, der dem Halbwellenpotential bei $K = 0$ entspricht. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich bei einer Dimerenbildung.

2.2 KALOUSEK-Umschalter

Die zahlreichen Faktoren, welche die Form der polarographischen Stufe beeinflussen, erfordern zusätzliche Methoden, um die einzelnen Effekte zu unterscheiden. Ein wichtiges Kriterium ist die polarographische Reversibilität. Ein System besitzt nur dann ein Redoxpotential, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit in beiden Richtungen ungleich Null ist. Reduktionspotential und Oxidationspotential zweier über einen Redoxprozeß zusammengehörenden Verbindungen haben den gleichen Wert. Polarographisch ausgedrückt, bedeutet dies, daß bei der getrennten Untersuchung zweier solcher Verbindungen die zugehörigen Halbwel-

lenpotentiale zusammenfallen müssen. Am zweckmäßigsten verwendet man zur Bestimmung des Redoxpotentials eine Lösung, welche sowohl die oxidierte als auch die reduzierte Depolarisatorform enthält. Bei Reversibilität wird dann ein Polarogramm erwartet, welches sowohl einen anodischen als auch einen kathodischen Grenzstrom aufweist. Dabei wird die Linie $i = 0$ ohne Änderung der Steigung durchlaufen. Ist das System total irreversibel, kann das Polarogramm die Linie $i = 0$ nicht durchschreiten, auch wenn beide Partner des Redoxsystems vorhanden sind, oder es gibt zumindest einen Potentialsprung bei $i = 0$. Ist eine der elektroaktiven Substanzen instabil, läßt sich das System nicht mehr in dieser Weise untersuchen. Trotzdem ist es auch in diesem Fall möglich, Aussagen über die Reversibilität zu machen, wenn man die Umschaltmethode nach KALOUSEK²¹ verwendet. Bei ihr wird nur eine Depolarisatorform benötigt. Im Grenzstrombereich ihrer polarographischen Welle bildet sich vor der Elektrode das zugehörige Reaktionsprodukt. Auch wenn es instabil ist, läßt es sich polarographisch erfassen, wenn die Elektrode mit Rechteckimpulsen von ca. 10 Hz polarisiert wird. Während der ersten Halbperiode liegt dabei ein konstantes Hilfspotential, z. B. im Grenzstrombereich, an der Elektrode. Die zweite Halbperiode dient der Registrierung. Hierbei polarisiert man die Tropfelektrode mit einer sich zeitlich ändernden Dreiecksspannung (Abbildung 2). Auf diese Weise wird ein Polarogramm erhalten, welches bei Reversibilität des

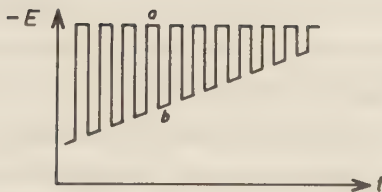


Abb. 2: Potential-Zeit-Verlauf bei Verwendung des KALOUSEK-Umschalters.

- a) konstantes Hilfspotential
- b) Registrierpotential

Systems eine einzige polarographische Stufe aufweist, die sowohl einen anodischen wie auch einen kathodischen Grenzstrom besitzt. Irreversible Systeme in diesem Sinn machen sich wie oben beschrieben durch einen Potentialsprung bei $i = 0$ oder durch Abwesenheit einer der beiden Grenzströme bemerkbar. Diese Untersuchungsmethode hat jedoch einen Nachteil. Durch die Umschaltfrequenz erhält man neben dem elektrolytischen Strom noch einen erheblichen Kapazitätsstrom. Damit ist die quantitative Auswertung umgeschalteter Kurven erschwert.

2.3 Potentialkontrollierte Elektrolyse

Sind organische Verbindungen in mehreren Stufen oxidierbar oder reduzierbar, so weist das Polarogramm auch mehrere Wellen auf. Um die Herkunft der einzelnen polaro-

graphischen Stufen aufzuklären, ist es notwendig, die zugehörigen Verbindungen auf chemischem Wege herzustellen. Oft gelingt dies aber nicht, da die Stufen auch von instabilen Zwischenprodukten stammen können. Mit Hilfe der potentialkontrollierten Elektrolyse lassen sich jedoch auf elektrochemischem Wege die Zwischenprodukte auf einfache Weise erhalten²². Dazu elektrolysiert man einen Depolarisator unter potentiostatischen Bedingungen bei seinem Grenzstrompotential. Verfolgt man die Elektrolyse quantitativ und integriert dabei den Strom über die Meßzeit, ergibt sich die geflossene Ladungsmenge. Um die an der Elektrodenreaktion beteiligte Elektronenanzahl n zu bestimmen, muß die Ladung mit der Konzentrationsänderung verknüpft werden. Dies geschieht, indem man vor und nach der Elektrolyse ein Polarogramm aufnimmt. Voraussetzung ist eine diffusionsbegrenzte polarographische Stufe. Durch U.V. Spektroskopie der elektrolysierten Lösungen lassen sich die auf diesem Wege erhaltenen Zwischenprodukte identifizieren.

2.4 Chronopotentiometrie mit Stromumkehr

Zur Erfassung chemischer Reaktionen, die einem Elektrodenprozeß nachgelagert sind, ist die Chronopotentiometrie mit Stromumkehr besonders geeignet²³⁻²⁷. Dabei wird eine Elektrode mit einem galvanostatischen Doppelimpuls belastet, wobei mit dem zweiten Impuls unter Stromumkehr das während des ersten Impulses vor der Elektrode erzeug-

te Produkt rückoxidiert bzw. -reduziert wird. Die erhaltenen Spannungs-Zeit-Kurven zeigen Potentialsprünge, sobald die Depolarisatorkonzentration an der Elektrodenoberfläche gleich Null wird. Die zugehörigen Zeiten τ_i werden als Transitionszeiten bezeichnet und sind ein Maß für die Konzentration C_A im Lösungsinnern bei reiner Diffusionspolarisation (SAND'sche Gleichung):

$$C_A = \frac{2 i_0 \tau^{1/2}}{nF (\pi D_A)^{1/2}} \quad (15)$$

wobei i_0 die Stromdichte bedeutet. Wenn das Depolarisatorprodukt B irreversibel weiterreagiert, erhält man die Konzentration c_B vor der Elektrode für einen Einzelimpuls als Funktion der Zeit mit Hilfe einer LAPLACE-Transformation zu:

$$c_B(0,t) = \frac{i_0}{nFD^{1/2}} \frac{\text{erf}(kt)^{1/2}}{k^{1/2}} \quad (16)$$

mit der Fehlerfunktion

$$\text{erf } u = \frac{2}{\pi^{1/2}} \int_0^u e^{-z^2} dz$$

und k der Geschwindigkeitskonstanten der irreversiblen Folgereaktion. Die Konzentration c_B läßt sich mit Gl. (16) auch für eine beliebige Aufeinanderfolge von Rechteckimpulsen angeben. Hierbei ist es zweckmäßig, nur eine Zeitskala t , vom Impulsbeginn an gerechnet, zu verwenden:

$$c_B(0,t) = \frac{i_1}{nF(Dk)^{1/2}} \operatorname{erf}(kt)^{1/2} - \frac{(i_1 + i_2)}{nF(Dk)^{1/2}} \operatorname{erf}[k(t-t_1)]^{1/2} \quad (17)$$

wobei i_1 und t_1 Stromdichte und Zeitdauer des ersten Impulses sind, und der zweite Stromimpuls die Stromdichte i_2 besitzt. Während des zweiten Impulses wird die Konzentration c_B vor der Elektrode für $(t - t_1) = \tau_2$ gleich Null. Mit den Abkürzungen

$$j = \frac{i_1}{i_1 + i_2} \quad \theta = \frac{t_1 + \tau_2}{\tau_2}$$

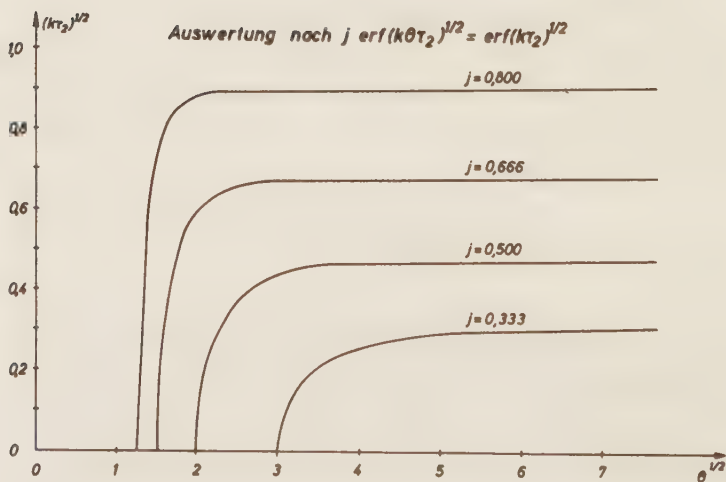


Abb. 3

erhält man für die Geschwindigkeitskonstante k einer irreversiblen Folgereaktion erster Ordnung:

$$j \operatorname{erf}(k\theta\tau_2)^{1/2} = \operatorname{erf}(k\tau_2)^{1/2} \quad (18)$$

Gl. (18) ist graphisch lösbar, wenn $\theta^{1/2}$ gegen $(k\tau_2)^{1/2}$ unter Verwendung der tabellierten Fehlerfunktion²⁸ aufgetragen wird. Aus Abbildung 3 ist zu ersehen, daß die Auswertung nach Gl. (18) unter stationären Bedingungen (horizontale Kurvenzweige) am genauesten ist. Stationarität liegt vor, wenn sich an der Elektrode eine konstante Konzentration c_B von B befindet, also die Bildungsgeschwindigkeit gleich der Summe aus Abreaktions- und Diffusionsgeschwindigkeit ist. Dieser Fall ist erreicht, wenn das Produkt $kt > 6$, da sich hierbei die Fehlerfunktion bis auf 1⁰/100 ihrem Grenzwert 1 nähert. In der Praxis ändert sich die Transitionszeit τ_2 dann nicht mehr mit der Zeit t_1 .

2.5 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten

Die potentialkontrollierte Elektrolyse in Kombination mit der Polarographie läßt sich nur unter speziellen Voraussetzungen zur eindeutigen Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D verwenden. Es wurde daher eine von RULFS²⁹ vorgeschlagene Anordnung zur unabhängigen Berechnung von D herangezogen. Sie besteht aus zwei Meßzellen gleichen Volumens V , die durch eine Glasfritte D4 der Stärke y und des Querschnittes Q getrennt sind. In eine Zelle wird die Lösung mit der zu untersuchenden Verbindung der Konzentra-

tion C gefüllt. Die andere Zelle enthält das gleiche Volumen an reinem Lösungsmittel. Die Versuchsbedingungen werden so gewählt, daß der gesamte Konzentrationsabfall zwischen beiden Lösungen in der Glasfritte stattfindet. Nach der Zeit t hat sich ein Konzentrationsverhältnis c_1/c_2 in den Volumina 1 und 2 eingestellt. Der Teilchen-

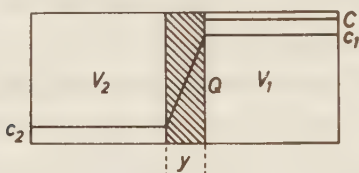


Abb. 4: Zur Ableitung von Gl. (20)

strom J durch die Glasfritte wird durch Gl. (19) ausgedrückt (vgl. auch Abb. 4):

$$J = dn/dt = D \frac{Q}{y} (c_1 - c_2), \quad (19)$$

wobei n die Teilchenzahl bedeutet. Mit $c_1 + c_2 = C$ und $c_2 = n/V$ bei $V_1 = V_2$ folgt:

$$dn/dt = D \frac{Q}{V y} (VC - 2n).$$

Nach der Trennung der Variablen und anschließender Integration erhält man:

$$- 1/2 \ln(VC - 2n) = D \frac{Q}{V y} t + \text{const.}$$

Mit den Anfangsbedingungen $t = 0$ und $n = 0$ ergibt sich:

$$\ln(1 - \frac{2n}{VC}) = - D \frac{Q}{V y} t.$$

Zur Zeit t ist $n/V = c_2$. Führt man eine Zellenkonstante K_z ein, lautet die Bestimmungsgleichung für den Diffusionskoeffizienten D :

$$\lg\left(1 - \frac{2c_2}{C}\right) = - K_z Dt. \quad (20)$$

3. Experimentelles

3.1 Herstellung von 7,8-Dihydrofolsäure

7,8-Dihydrofolsäure wird durch Reduktion von Folsäure mit Natriumdithionit in gepufferter Lösung bei pH 6 gewonnen³⁰.

Dazu wurde zunächst die Folsäure (Merck AG, Darmstadt) umgefällt³¹. Man suspendiert 1 g Folsäure in 100 ml Wasser und löst sie unter Rühren durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter Ammoniaklösung. Danach wird die Lösung mit 40 mg Aktiv-Kohle (Merck AG, Darmstadt) für 5 Minuten zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Nach dem Abkühlen fügt man langsam 0,1 n HCl zu, bis pH 3 erreicht ist. Die ausgefallene Folsäure wird durch einen Büchnertrichter abgesaugt, einmal mit 0,001 n HCl, 3 mal mit Wasser, mit 95 %igem Äthanol und mit wasserfreiem Äther gewaschen. Die so gereinigte Substanz wird bei 0,1 Torr getrocknet.

Zur Herstellung von 7,8-Dihydrofolsäure werden 10 g Ascorbinsäure in 50 ml Wasser gelöst und mit 1 n NaOH ein pH-Wert von 6 eingestellt. Das Puffervolumen sollte 100 ml betragen. Dazu gibt man eine Lösung von 382 mg (0,86 mmol)

gereinigter Folsäure in 16,0 ml 0,1 n NaOH. Nun werden 4,0 g festes Natriumdithionit portionsweise eingebracht. Nach seiner Auflösung wird noch 5 Minuten bei Raumtemperatur nachgerührt, dann mit einer Eis-Kochsalz-Mischung auf 0°C abgekühlt. Unter starkem Rühren werden langsam (0,1 ml/min) ca. 50 ml 1 n HCl zugetropft, bis pH 2,8 erreicht ist. Zur pH-Messung empfiehlt sich die Verwendung einer Glaselektrode. Nach 10 min wird der Niederschlag durch eine Glasfritte D4 abgetrennt. Der Rückstand wird in 100 ml Natriumascorbatpuffer pH 6 gelöst. Eventuell ist die Zugabe einer geringen Menge 1 n NaOH notwendig. Die anschließende Fällung mit 1 n HCl erfolgt schnell (ca. 5 min) unter Kontrolle des pH-Wertes. Bei pH 2,8 ist die 7,8-Dihydrofolsäure als weißer kristalliner Niederschlag erhältlich. Er wird von der Lösung abgetrennt und dreimal mit eiskalter 0,001 n HCl gewaschen. Die im Hochvakuum getrocknete Substanz ist stark licht- und luftempfindlich. Daher sollte die gesamte Reduktion bei Dunkelheit stattfinden. Alle präparativen Operationen wurden in Schlenkrohren unter Stickstoffatmosphäre ausgeführt. Während und nach der Fällung der Dihydrofolsäure darf die Versuchstemperatur 2°C nicht übersteigen. Alle verwendeten Lösungen müssen sorgfältig entgast sein.

3.2 Herstellung von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure

Durch katalytische Hydrierung von Folsäure wird 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure erhalten³². In einer kleinen stickstoff-

gespülten Hydrierapparatur³³ werden 48 mg PtO_2 (Merck AG, Darmstadt) in 20,0 ml Trifluoressigsäure 10 min vorhydriert. Danach gibt man 340 mg (0,77 mmol) Folsäure zu, die in 8,0 ml Trifluoressigsäure gelöst wurde. Nach 90 min ist die Wasserstoffaufnahme beendet. Die Lösung ist schmutziggelb geworden. Es wird 10 min nachgerührt und danach der Katalysator durch eine Glasfritte D3 abgetrennt. Die Ausfällung der Tetrahydrofolsäure als Hydrogensulfat erfolgt unter Eiskühlung. Dazu wird eine gekühlte, entgaste Lösung von 0,0455 ml konzentrierter Schwefelsäure in 70 ml absolutem Äthanol langsam zugetropft. Man läßt den Niederschlag 15 min absitzen, und trennt ihn mittels einer Glasfritte D4 von der Mutterlauge. Er wird dreimal mit eiskaltem absoluten Äthanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Wird unter völligem Luft-, Licht- und Wasserausschluß gearbeitet, erhält man 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäurehydrogensulfat als reinweißes Pulver. Solange die Substanz noch nicht ganz trocken ist, wird sie bei Anwesenheit geringer Mengen Feuchtigkeit rötlich.

3.3 Zusammensetzung und Vorbehandlung der Versuchslösungen

Die Versuchslösungen enthielten als Leitsalz 0,1 n KNO_3 . Sie wurden mit BRITTON-ROBINSON-Puffer³⁴ (Tabelle 1) auf einem konstanten pH-Wert gehalten, der mit einer Glaselektrode bestimmt wurde. Ein Zusatz von Maximumunterdrückern war nicht notwendig. Als Lösungsmittel diente doppelt destilliertes Wasser. Die Depolarisatorkonzentration lag

zwischen 10^{-3} und 10^{-5} m. Die Arbeitstemperatur betrug im allgemeinen $(25 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ thermostatiert. Als Schutzgas hat sich über BTS-Katalysator (BASF) und Chrom-II-sulfatlösung gereinigter, nachgereinigter Stickstoff bewährt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der BRITTON-ROBINSON-Pufferlösungen

Nach einer Mischung der Stammlösungen A und B in den angegebenen Verhältnissen stellt sich ein bestimmter pH-Wert ein.

Stammlösung A: 0,04 m (3,92 g/l) H_3PO_4
 0,04 m (2,47 g/l) H_3BO_3
 0,04 m (2,40 g/l) CH_3COOH

Stammlösung B: 0,20 m (8,00 g/l) NaOH

A in ml	B in ml	pH
50	-	1,81
50	7,50	2,56
50	10,00	3,29
50	17,50	5,02
50	25,00	6,80
50	30,00	7,96
50	37,50	8,95
50	41,25	10,88
50	50,00	11,98

Die Herstellung der gewünschten Meßlösung erfolgte in einem Schlenkrohr. In das Gefäß wurde zunächst nur die gepufferte Leitsalzlösung eingefüllt, im Wasserstrahlvakuum

entgast und unter Stickstoffatmosphäre gesetzt. Danach wurde die eingewogene Substanz eingetragen und unter Rühren gelöst. Die so vorbereitete Lösung wurde in die mit Stickstoff gespülte Meßzelle eingefüllt. Um eine Zersetzung im Licht zu vermeiden, wurden die Messungen bei Dunkelheit ausgeführt.

3.4 Polarographische Zelle und Meßanordnung

Die normalen Polarogramme wurden mittels einer thermostatisierbaren, elektrolytischen Zelle von 5 ml Inhalt aufgenommen. Die Arbeitselektrode war eine Quecksilbertropfelektrode, Gegen- und Referenzelektrode eine gesättigte Kalomelelektrode. Letztere war über eine KNO_3 -Brücke und Agar-Agar-Stopfen mit der Zelle verbunden. Die Polarogramme wurden mit dem im Anhang 1 beschriebenen Gerät aufgenommen. Der Potentialvorschub betrug 100 mV/min. Die umgeschalteten Kurven wurden mit einem KALOUSEK-Umschalter erhalten, dessen Schaltbild und Arbeitsweise im Anhang 3 beschrieben ist. Eine Frequenz von 8 - 10 Hz ist für die Untersuchungen am besten geeignet.

3.5 Anordnung für die Elektrolyse bei konstantem Potential

Der Aufbau der Meßzelle für die potentialkontrollierte Elektrolyse ist aus Abbildung 5 zu entnehmen. Sie besteht aus einem thermostatisierbaren Zellenmantel, einem Quecksil-

bersee als Arbeitselektrode, einem stickstoffumspülten Platinblech als Gegenelektrode und einer gesättigten Kalomelelektrode als Vergleichselektrode. Die Gegenelektrode ist durch eine Glasfritte D5 vom Versuchsvolumen getrennt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde zusätzlich eine Quecksilbertropfelektrode angebracht, Referenzelektrode

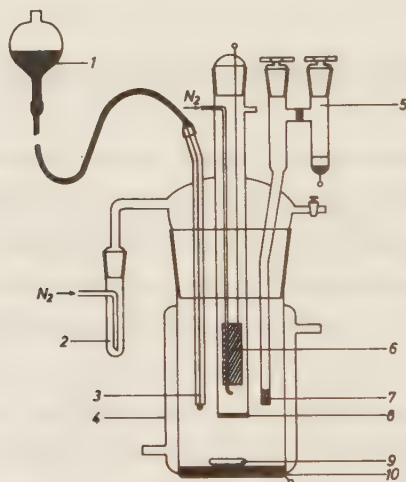


Abb. 5: Meßzelle für die potentialkontrollierte Elektrolyse

1 Quecksilbervorratsgefäß, 2 Blasenähler, 3 Quecksilbertropfelektrode, 4 thermostatierbarer Zellenmantel, 5 gesättigte Kalomelektrode, 6 Plattingegenelektrode, 7 Agar-Agar-Stopfen, 8 Glasfritte D5, 9 Magnetrührstab, 10 Quecksilbersee

war auch hierbei eine gesättigte Kalomelelektrode. Der Boden der Zelle ist eben, damit die Lösung mittels eines Magnetrührers während der Elektrolyse bewegt werden konnte.

Durch einen geringen Überdruck an Schutzgas wurde die Luft ferngehalten. Ein Blasenähler diente dabei zur Kontrolle. Wie bei der polarographischen Aufzeichnung wurde auch bei der Elektrolyse unter Ausschluß von Licht gearbeitet. Die Zusammensetzung der Lösung und ihre Vorbehandlung sind Abschnitt 3.3 zu entnehmen. Schaltplan und Wirkungsweise der zugehörigen elektronischen Apparatur sind im Anhang 1 erklärt.

3.6 Messungen am hängenden Quecksilbertropfen

Für die Untersuchungen nachgelagerter Reaktionen eignete sich eine Meßanordnung, wie sie von F. MÖLLERS³⁵ beschrieben wurde (Anhang 2). Die Arbeitselektrode war ein an einer Kapillare hängender Quecksilbertropfen, dessen Größe mittels eines magnetischen Ventils reproduzierbar eingestellt werden konnte. Seine Oberfläche wurde über das Tropfengewicht berechnet, wobei Kugelform angenommen wurde. Damit ergab sich ein Tropfenradius $r_0 = 0,080$ cm und eine Oberfläche $0=8,0$ mm². Als Gegenelektrode diente ein zylindrisches Platinnetz, als Vergleichselektrode eine gesättigte Kalomelelektrode. Die Zelle war thermostatierbar und die Versuchslösungen (siehe 3.3) konnten unter Luftausschluß gehalten werden. Zur Ausführung der Messungen wurde ein Galvanostat (Anhang 2) benutzt, welchem anodische und kathodische Rechteckimpulse entnommen werden konnten. Die Flankensteilheit der Impulse lag bei 10 μ s und genügte den ex-

perimentellen Anforderungen. Die erhaltenen Potential-Zeit-Kurven wurden mit einem X-Y/YT-Schreiber (Servogor Typ RE 551, Metrawatt AG, Nürnberg) registriert. Für die Ausmessung der Transitionszeiten diente ein von REINMUTH³⁶ angegebenes Verfahren. Dazu legt man die Tangenten an die steilen Kurvenäste der Potential-Zeit-Kurven und bestimmt den Abstand zwischen ihnen längs der Wendetangente der Potentialstufe. Damit wird die Auf- und Umladezeit der Doppelschicht bei Doppelimpulsen weitgehend eliminiert. Die Theorie der galvanostatischen Einschaltvorgänge setzt eine ebene Elektrodenoberfläche voraus. Dazu muß das Verhältnis von Tropfenradius r_0 zu Diffusionsschichtdicke sehr groß sein. Ist dies nicht der Fall, muß man mit sphärischer Diffusion rechnen. Hierzu dient Gl. (21), die für $D_A \tau / r_0^2 \ll 1$ in die SAND'sche Gleichung (Gl. 15) übergeht:

$$i_0 \tau^{1/2} = \frac{nF(D_A \tau)^{1/2} C_A}{2} \left[\frac{\frac{2}{\tau^{1/2}} \frac{(D_A \tau)^{1/2}}{r_0}}{1 - \exp \left[\frac{D_A \tau}{r_0^2} \right] \operatorname{erfc} \left[\frac{(D_A \tau)^{1/2}}{r_0} \right]} \right] \quad (21)$$

Für einen Diffusionskoeffizienten von $D = 3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, einen Tropfenradius von $r_0 = 0,08 \text{ cm}$ und einer Transitionszeit $\tau_1 = 1 \text{ s}$ macht sich die sphärische Diffusion mit einem Fehler von 1 % bemerkbar. Bei Transitionszeiten von 10 s wächst der Fehler auf 3 % an.

Wegen anderer Fehlerquellen bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten blieb diese Korrektur (Gl. 21) unberücksichtigt, obwohl t_1 manchmal größer als 10 s war. Die obige Fehlerabschätzung erfolgte unter Zuhilfenahme eines Kleincomputers (Wang 500, Wang Laboratories GmbH, Frankfurt).

3.7 Messung des Diffusionskoeffizienten

Die Abbildung 6 zeigt den Aufbau der hierzu verwendeten Zelle. Es werden zunächst je 8 ml zweier Lösungen hergestellt, wobei eine nur Leitsalz ($0,1 \text{ m KNO}_3$) und BRITTON-ROBINSON-Puffer (pH 7) und die zweite daneben noch $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$

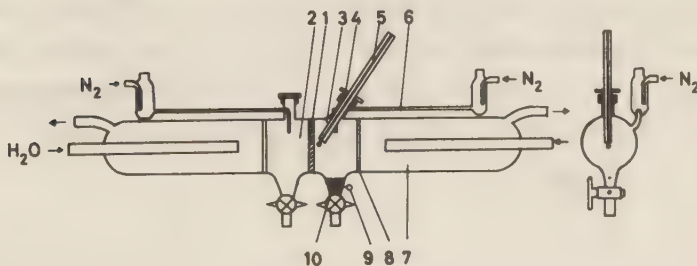


Abb. 6: Zelle zur Messung des Diffusionskoeffizienten von Folsäure

1 Glasfritte, D4, 2, 3 Meßzelle, 4 Gummidichtung, 5 Tropfkapillare, 6 Ausgleichskapillare, 7 Thermostatieransatz, 8 Glasplatte, 9 Pt-Einschmelzung, 10 Quecksilbergegenelektrode.

der zu untersuchenden Substanz enthalten. Sie werden entgast und unter Stickstoffatmosphäre gleichzeitig von unten bis zu den angesetzten waagerechten Kapillaren 6 in die Zellen eingefüllt. Die Kapillaren sorgen dafür, daß der hydrostatische Druck auf beiden Seiten gleich bleibt, auch wenn sich die Flüssigkeitsvolumina während des Versuches etwas ändern. Dadurch wird jede Rückströmung durch die Fritte verhindert. Die Arbeitstemperatur lag bei 25°C (thermostatiert), und die Versuchsdauer betrug 48 Stunden. Mit Hilfe der Quecksilbertropfelektrode 5 wurde die Konzentration c alle 4 Stunden polarographisch bestimmt. Die Elektrode ist schräg angesetzt, damit die Lösung vor der Frittenoberfläche durch den abfallenden Tropfen umgerührt wird. Als Gegenelektrode diente das Bodenquecksilber. Die Zellenkonstante K_z wurde unter Verwendung von Eichsubstanzen bestimmt. Dazu dienten Cd^{2+} und Tl^+ . Ihre Diffusionskoeffizienten wurden von RULFS²⁹ in 0,1 n KNO_3 -Lösung zu $D_{\text{Cd}^{2+}} = 0,76 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $D_{\text{Tl}^+} = 1,67 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmt. Für die Zellenkonstante K_z ergab sich damit der Wert $K_z = 0,200 \text{ cm}^{-2}$.

4. Meßergebnisse und ihre Diskussion

4.1 Polarographische Untersuchungen

Zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus im System Folsäure - Dihydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure standen die aus Folsäure auf chemischem Wege zugänglichen Verbindungen, 7,8-Dihydrofolsäure und 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, zur Verfügung. Da diese Substanzen verschiedene Reduk-

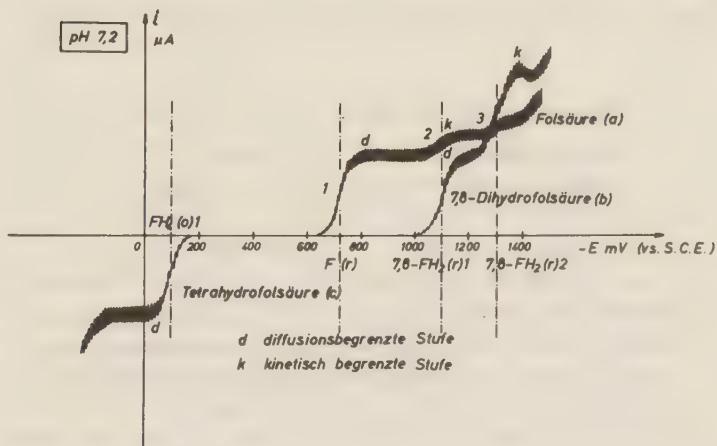


Abb. 7: Polarogramme von (a) Folsäure, (b) 7,8-Dihydrofolsäure, (c) Tetrahydrofolsäure in BRITTON-ROBINSON-Puffer, pH 7,2. Die Bezeichnung der Halbwellenpotentiale auf der Abszisse entsprechen denen der Abb. 10.

tionsstufen der Ausgangsverbindung darstellen, lassen sich Gemeinsamkeiten in ihrem elektrochemischen Verhalten erwarten. Sie sind alle im Arbeitsbereich der Quecksilberelektrode elektroaktiv und durch ihre polarogra-

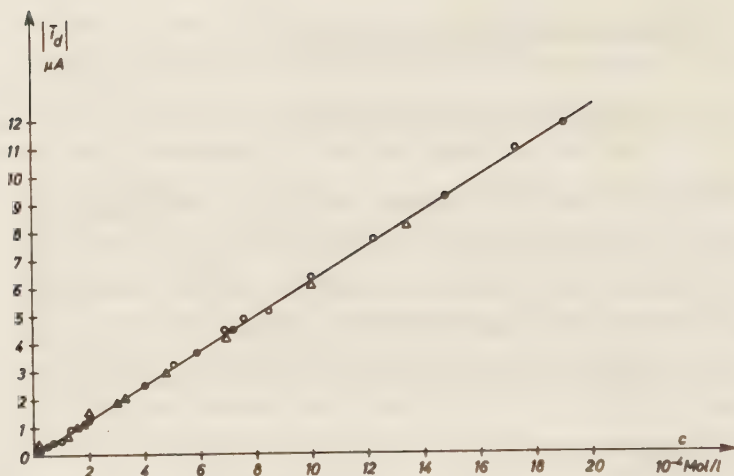


Abb. 8: Konzentrationsabhängigkeit der Grenzströme $|I_d|$:

○ erste Reduktionsstufe von Folsäure

△ Oxidationsstufe von Tetrahydrofolsäure

Aus der Steigung $d|I_d|/dc$ läßt sich mit Gl. (1) die Zellenkonstante zu $k^* = 1,91 \cdot 10^3 \text{ As}^{1/2} \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$ mit $k^* = I_d / (nD^{1/2}C) = a^* F m^{2/3} \tau^{1/6}$ bestimmen. Für $n = 2$ ergibt sich damit der Diffusionskoeffizient sowohl für Folsäure als auch für Tetrahydrofolsäure zu $D = (2,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

phischen Wellen zu identifizieren³⁷. Da ihre Oxidation oder Reduktion mit der Abgabe bzw. Aufnahme von Protonen verbunden ist, müssen die untersuchten Lösungen ausreichend gepuffert werden.

4.1.1 Reduktion von Folsäure

Das polarographische Verhalten von Folsäure wurde zwischen pH 1,8 und pH 12 verfolgt. Dabei treten drei Reduktionsstufen auf, wobei nur die erste über den gesamten Bereich beobachtet wird (Abb. 7, Kurve a,1). Ihre

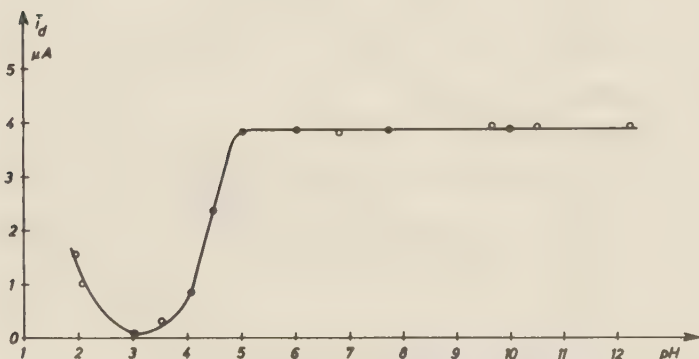


Abb. 9: pH-Abhängigkeit des Grenzstromes I_d der ersten Reduktionsstufe von Folsäure.
(pH 3: Löslichkeitsminimum)

Höhe ist proportional der Folsäurekonzentration und unabhängig vom pH-Wert (Abb. 8 und 9). Die Auftragung der Halbwellenpotentiale gegen die Wasserstoffionenkonzentration gibt Abbildung 10 wieder. Aus ihr ist der Richtungskoeffizient der ersten Folsäurereduktionsstufe (Abb. 10, Kurve F (r)) mit 60 mV/pH zu entnehmen. Dies bedeutet, daß pro aufgenommenem Elektron ein Proton verbraucht wird. Die logarithmische Analyse des einzelnen Polarogramms liefert für die Zahl der an der Durchtrittsreaktion beteilig-

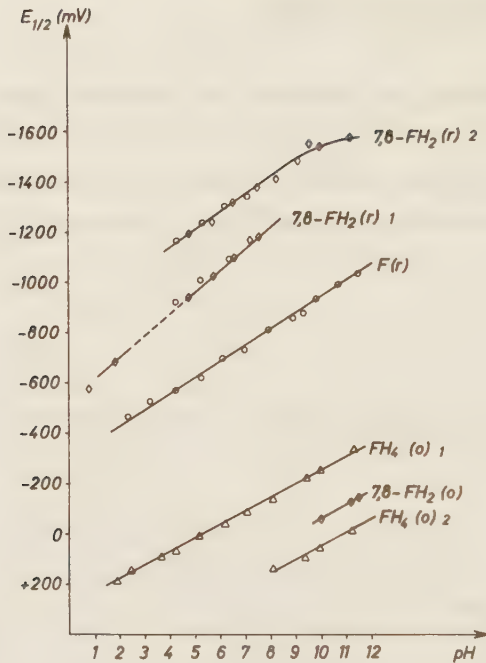


Abb. 10: Abhängigkeit der Halbwellenpotentiale vom pH-Wert. Ordinate: Potential gegen die gesättigte Kalomel-elektrode.

F (r) erste Reduktionsstufe von Folsäure

$7,8-FH_2(r) 1$ erste Reduktionsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure

$7,8-FH_2(r) 2$ zweite Reduktionsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure

$7,8-FH_2(o)$ Oxidationsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure

$FH_4(o) 1$ erste Oxidationsstufe von Tetrahydrofolsäure

$FH_4(o) 2$ zweite Oxidationsstufe von Tetrahydrofolsäure

Die Meßpunkte entsprechen den Halbwellenpotentialen der polarographischen Stufen von

○ Folsäure, △ Tetrahydrofolsäure, ◇ 7,8-Dihydrofolsäure.

ten Elektronen je nach Depolarisatorkonzentration ($10^{-3} \dots 10^{-5} \text{ m}$) und pH-Wert Werte zwischen $n = 1$ und $n = 2$. Da die Auswertung auf diese Weise jedoch mögliche Komplikationen während des Elektrodenprozesses unberücksichtigt läßt, war es notwendig, den Diffusionskoeffizienten von Folsäure unabhängig zu bestimmen. Die Messungen mittels der Diffusionszelle ergaben einen Wert von $D = (3,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Zur Kontrolle erfolgte eine Bestimmung über das Sedimentations-Gleichgewicht in der Ultrazentrifuge mit $D = (2,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ³⁸. Die Unterschiede sind wohl auf das Vorhandensein von Puffer und Leitsalz bei den Versuchen mit der Diffusionszelle zurückzuführen. Damit ergibt sich über die ILKOVIC-Gleichung für n der Wert 2. Die erste Reduktionsstufe von Folsäure ist somit ein Zweielektronenschritt.

Die beiden anderen Reduktionsstufen (Abb. 7, Kurve a, 2 und 3) sind nur im pH-Bereich ≤ 7 deutlich. Ihre Stufenhöhen sind bei pH 2 mit der ersten vergleichbar, nehmen aber mit steigenden pH-Wert ab. Außerdem sind sie von der Art des verwendeten Puffers abhängig. In BRITTON-ROBINSON-Puffer werden kleinere Grenzströme erhalten als in Phosphatpuffer (vgl. Zit. 48). Eine quantitative Verfolgung der beiden Wellen ist durch das Löslichkeitsminimum von Folsäure bei pH 3 (Abb. 9) und damit durch die Ungenauigkeit in der Konzentrationsbestimmung eingeengt. In diesem pH-Gebiet beträgt die Löslichkeit von Folsäure nur $5 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$. Entsprechendes gilt auch für 7,8-Dihydrofolsäure und Tetrahydrofolsäure.

4.1.2 Reduktion von 7,8-Dihydrofolsäure

7,8-Dihydrofolsäure zeigt polarographisch oberhalb pH 9,5 eine Oxidationswelle, die jedoch nur über einen kleinen Bereich zu verfolgen ist, da sie durch die Bildung von Quecksilberphosphat überdeckt wird und außerdem nur eine geringe Steilheit aufweist. Interessanter ist das Reduktionsverhalten der 7,8-Dihydrofolsäure. Sie zeigt zwei Reduktionsstufen (Abb. 10, Kurve 7,8-FH₂(r)1 und 2). Die zweite Stufe ist bei pH-Werten $\leq 4,7$ nicht zu erkennen, weil sie durch den kathodischen Endanstieg überdeckt wird. Zwischen pH 4,7 und pH 8,2 sind beide Stufen realisierbar. Im alkalischen Milieu weist die zweite Reduktionsstufe ein Strommaximum auf, welches sich nicht durch Gelatinezusatz unterdrücken läßt. Seine Ursache konnte bisher nicht gefunden werden. Die Stufe erscheint oberhalb pH 8 allein und nimmt bei konstanter Depolarisatorkonzentration mit steigendem pH-Wert ab. Der Richtungskoeffizient beträgt für die Kurve 7,8-FH₂(r)1: 85 mV/pH (Abb. 10) und für die Kurve 7,8-FH₂(r)2: 70 mV/pH (Abb. 10). Beide stimmen in ihren Halbwellenpotentialen mit denen der zweiten und dritten Reduktionsstufe von Folsäure überein (Abb. 7).

4.1.3 Oxidation von Tetrahydrofolsäure

Tetrahydrofolsäure läßt sich zwischen pH 2 und pH 12 in einer Stufe mit einem Richtungskoeffizienten von 55 mV/pH oxidieren (Abb. 10, FH₄(o)1). Hierbei ist die Stufenhöhe

proportional der Tetrahydrofolsäurekonzentration (Abb. 8) und über den gesamten untersuchten Bereich pH-unabhängig. Bei gleichen Einwaagekonzentrationen von Folsäure und Tetrahydrofolsäure wird nur ein 4 %iger Unterschied in der Grenzstromstärke erhalten. Dies läßt den Schluß zu, daß Tetrahydrofolsäure den gleichen Diffusionskoeffizienten wie Folsäure besitzt, und mithin ihre Oxidationsstufe einem Zweielektronenschritt entspricht. Oberhalb pH 8 wird eine zweite Oxidationswelle beobachtet. Sie weist eine größere Steilheit als die entsprechende Stufe bei 7,8-Dihydrofolsäure auf und ist daher besser von der anodischen Auflösung des Quecksilbers und der damit verbundenen Überlagerung der Wellen zu trennen.

4.1.4 Abhängigkeit von der Behälterhöhe und Reversibilität bei den polarographischen Stufen.

Alle untersuchten Substanzen zeigen mit ihren ersten polarographischen Stufen eine der Quadratwurzel der Quecksilberniveauhöhe abhängige Grenzstromstärke (in Abb. 7 mit "d" gekennzeichnet). Es sind diffusionsbegrenzte Vorgänge. Die zweiten Reduktionsstufen sowohl von Folsäure als auch von 7,8-Dihydrofolsäure sind von der Behälterhöhe unabhängig und damit kinetisch begrenzt (Abb. 11). Dies bedeutet, daß während des ersten Zweielektronenschrittes vor der Elektrode instabile Verbindungen erzeugt werden. Sie unterliegen einer chemischen Reaktion, bevor eine weitere Elektronenaufnahme stattfindet. Für die zweite Reduk-

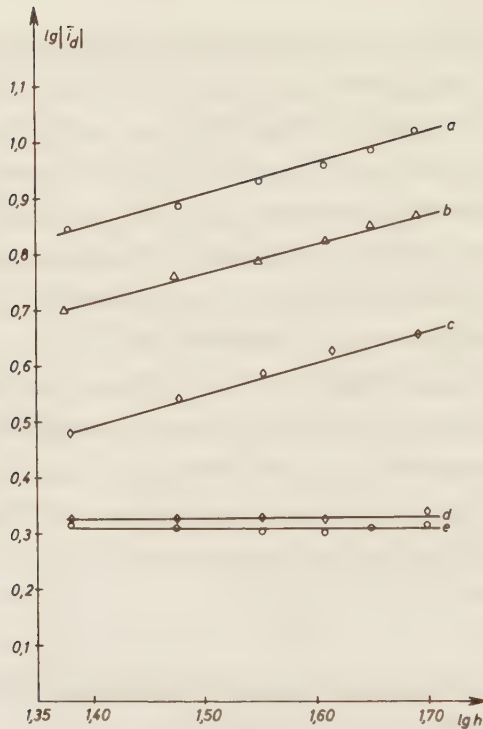


Abb. 11: Abhängigkeit der Behälterhöhe h von den Grenzstromstärken $|i_d|$ der polarographischen Stufen.

- a) erste Reduktionsstufe von Folsäure, pH 6,8, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ m}$
- b) erste Oxidationsstufe von Tetrahydrofolsäure, pH 6,8, $c = 7 \cdot 10^{-4} \text{ m}$
- c) erste Reduktionsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure, pH 6,8, $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$
- d) zweite Reduktionsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure, pH 9,9, $c = 10^{-3} \text{ m}$
- e) zweite Reduktionsstufe von Folsäure, pH 6,8, $c = 10^{-3} \text{ m}$

Die durchgezogenen Kurven a, b und c geben den theoretischen Verlauf ($d \lg |i_d| / d \lg h = 0,5$) für diffusionsbegrenzte Vorgänge wieder.

Tabelle 2: Temperaturabhängigkeit der polarographischen Stufenhöhen

T in °C	F(r)1 $\bar{i}_d$ in μA	F(r)2 $\bar{i}_k$ in μA	FH ₂ (r)1 $\bar{i}_d$ in μA	FH ₄ (o)1 $\bar{i}_d$ in μA
17,0	7,70	4,40		
18,5				4,60
20,5			3,80	
25,0	9,25	4,50	4,15	5,10
35,0	10,40	4,35	4,75	5,85
45,0	12,20	4,50	5,30	6,70

F(r)1: erste Reduktionsstufe von Folsäure, pH 6,5,
 $c = 1,46 \cdot 10^{-3} m$

F(r)2: zweite Reduktionsstufe von Folsäure, pH 6,5,
 $c = 1,46 \cdot 10^{-3} m$

FH₂(r)1: erste Reduktionsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure,
pH 6,6, $c = 0,65 \cdot 10^{-3} m$

FH₄(o)1: erste Oxidationsstufe von Tetrahydrofolsäure,
pH 6,6, $c = 0,78 \cdot 10^{-3} m$

Leitsalz: 0,1 m KNO₃, Puffer: BRITTON-ROBINSON-Puffer.

Bei 25°C besitzt die verwendete Meßzelle eine Zellenkonstante $k^* = 1,91 \cdot 10^3 \text{ As}^{1/2} \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$ (siehe auch Abb. 8).

Anmerkung zu Seite 47: Die Richtungskoeffizienten der $E_{1/2}/\text{pH}$ -Kurven von 7,8-Dihydrofolsäure (Abb. 10, Kurven 7,8-FH₂(r)1 und 2) sind $>60 \text{ mV/pH}$. Die nach der Durchtrittsreaktion aufgenommene Protonenzahl wird trotzdem zu zwei angenommen, da a) die Dissoziationskonstanten die Steigung der $E_{1/2}/\text{pH}$ -Kurven beeinflussen (Gl. 6 und 7), und es b) bei $\text{pH} > 7$ unwahrscheinlich ist, daß mehr Protonen als Elektronen aufgenommen werden.

tionsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure konnte dies nur in dem pH-Bereich sicher festgestellt werden, wo sie kein Strommaximum aufwies (Abb. 7, bezeichnet mit "k"). Die Temperaturabhängigkeit des Grenzstromes der ersten Stufen aller drei untersuchten Verbindungen beträgt 1,5 %/Grad und entspricht damit denen diffusionsbegrenzter Vorgänge. Die zweite Reduktionsstufe von Folsäure ist temperaturunabhängig (Tabelle 2).

Unter Verwendung der Umschaltmethode nach KALOUSEK wurde die Reversibilität der einzelnen polarographischen Wellen überprüft. Mit einem konstanten Hilfspotential im Grenzstrombereich der ersten Stufen von Folsäure und von Tetrahydrofolsäure werden Depolarisatorprodukte erzeugt, die das gleiche Halbwellenpotential wie die zugehörigen Depolarisatoren aufwiesen. Die Strom-Spannungs-Kurven durchlaufen hierbei vom anodischen Grenzstrom zum kathodischen Grenzstrom die Galvanometernulllinie ohne Potentialsprung. Es handelt sich bei den ersten Stufen somit um reversible Systeme. Die Steigung nF/RT der umgeschalteten Kurven ist geringer als bei normaler Polarographie. Für n ergibt sich $0,8 < n < 1$. Das läßt sich auf den Einfluß des Kapazitätsstromes zurückführen. Man könnte außerdem auch eine geringe Durchtrittshemmung annehmen.

Wird das gleiche Verfahren auf die Reduktionsstufen von 7,8-Dihydrofolsäure angewendet, erweist sich die erste Stufe als total irreversibel. Es wird kein anodischer Anteil erhalten. Liegt das Hilfspotential im Grenzstrombereich der

zweiten Welle, wird eine anodische Welle beobachtet. Das gilt auch dann, wenn die erste kathodische Welle nicht beobachtet wird, also im pH-Bereich > 9 . Das Halbwellenpotential der Oxidationsstufe entspricht dem der ersten von Tetrahydrofolsäure. Aus diesem Verhalten folgt, daß es sich bei der zweiten Stufe um eine irreversible Durchtrittsreaktion handelt.

4.2 Potentialkontrollierte Reduktion von Folsäure

4.2.1 Reduktion im pH-Bereich zwischen 5 und 7

Folsäure wurde zwischen pH 5 und pH 7 der potentialkontrollierten Elektrolyse unterworfen³⁹. Das konstante Elektrolysepotential wurde jeweils im Grenzstrombereich einer polarographischen Welle gewählt. Damit wird aus dem analytischen Verfahren, der Polarographie, eine präparative Methode. Mit der ersten Reduktionsstufe von Folsäure beginnend, wird auf diese Weise, immer die daraus folgende untersucht. Dazu ist es notwendig, die Konzentrationsänderung in situ polarographisch zu verfolgen. Die Abbildung 12 gibt den Versuchsablauf wieder. Die zugehörigen Polarogramme sind schematisch dargestellt.

Die Elektrolyse von Folsäure im Bereich ihrer ersten Reduktionswelle entspricht einem Zweielektronenschritt. Damit wird die unter 4.1.1 gemachte Aussage über die Anzahl der Elektronen pro Durchtrittsreaktion gestützt. Nach der

Reduktion unter diesen Bedingungen ist die erste Reduktionsstufe von Folsäure verschwunden. Es wird das Polarogramm der 7,8-Dihydrofolsäure erhalten (Abb. 12, Kurve b).

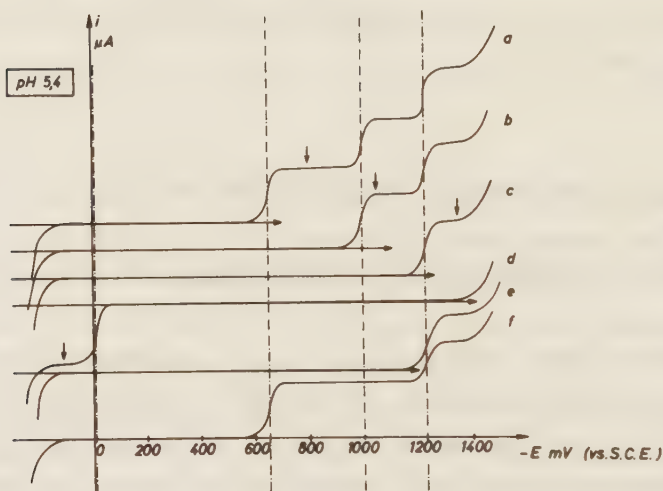


Abb. 12: Potentialkontrollierte Elektrolyse von Folsäure bei pH 5,4. Abszisse: Elektrolysepotential gegen die gesättigte Kalomelelektrode, Ordinate: kathodischer Strom. Durch die Elektrolyse beim Potential des Pfeiles wird jeweils eine Substanz erzeugt, die das darunterliegende Polarogramm ergibt.

a) Folsäure, f) 2-Amino-4-hydroxy-6-methylpteridin (6-Methylpterin).

Durch Oxidation von e) mit Luftsauerstoff wird f) erhalten.

Vergleicht man die Stufenhöhe vor der Reduktion mit der jetzt ersten Reduktionsstufe, so entsprechen sie einander. Im weiteren Verlauf der Elektrolyse werden wiederum zwei Elektronen verbraucht (Abb. 12, Kurve b, beim Pfeil). Da-

raus läßt sich auf die Gleichheit der Diffusionskoeffizienten von Folsäure und 7,8-Dihydrofolsäure schließen. Die vollständige Reduktion liefert Kurve c in Abbildung 12 mit nur einer Reduktionsstufe. Ein nochmaliger reduktiver Zweielektronenschritt läßt auch diese Stufe verschwinden. Das entstandene Produkt ist nur noch oxidierbar (Abb. 12, Kurve d). Damit ist eine Tetrahydroverbindung entstanden. Ihre polarographische Stufenhöhe ist größer als die des Ausgangsprodukts Folsäure (erste Stufe). Wird eine elektrolytische Oxidation im Grenzstrombereich der anodischen Welle durchgeführt, erhält man ein Polarogramm mit einer Reduktionswelle (Abb. 12, Kurve e). Ihr Halbwellenpotential ist mit dem der dritten Reduktionswelle von Folsäure identisch. Eine Weiteroxidation ist auf elektrochemischem Wege nicht möglich. Bei der Einwirkung von Sauerstoff auf die zuletzt elektrolytisch hergestellte Substanz erhält man die Kurve f in Abbildung 12 mit zwei Reduktionsstufen. Das entstandene Endprodukt kann nicht Folsäure sein, da deren zweite Reduktionswelle im Polarogramm nicht enthalten ist.

Die gesamte elektrolytische Reduktion von Folsäure ist mit einem Verbrauch von sechs Elektronen pro Molekül verbunden. Aus den polarographischen Untersuchungen wird die gleichzeitige Aufnahme von sechs Protonen gefordert (Fußnote S. 43). Im Gegensatz dazu sind zur vollständigen Hydrierung der Folsäure nur vier Elektronen und vier Wasserstoffionen notwendig. Das entspricht einer Reduktion des Piazinringes im Pterinsystem. Wie die in Zit. 30 und 32 ange-

fürten präparativen Untersuchungen beweisen, wird der Pyrimidinring nicht angegriffen. Dies wird auch durch elektrochemische Untersuchungen an 2,4,6-trisubstituierten Pyrimidinen bestätigt, da diese keine polarographische Stufe besitzen⁴⁰. SMITH und ELVING⁴¹ konnten jedoch zeigen, daß Pyrimidine dann polarographisch reduzierbar sind, wenn das konjugierte System $N=C-C=C$ im Ring vorliegt. Im Pterinsystem ist der Pyrimidinring in Stellung 4 mit einer Hydroxylfunktion substituiert. Diese kann in der Lactim- oder Lactamform vorliegen, wobei zu erwarten wäre, daß die



Lactimform elektroaktiv ist. Durch U.V.-spektroskopische Messungen an diesem System wurde jedoch gezeigt, daß das Gleichgewicht weit auf der Seite der Lactamform liegt^{42,43}. Das Endprodukt (Abb. 12, Kurve f) wurde U.V.-spektroskopisch eindeutig als 6-Methylpterin (2-Amino-4-hydroxy-6-methylpteridin) identifiziert⁴. Ein Vergleichspolarogramm konnte dieses Ergebnis bestätigen. Damit läßt sich der Verbleib der restlichen zwei Elektronen erklären. Es findet eine reduktive Abspaltung der Seitenkette zwischen C-9 und N-10 statt. Die zu dieser irreversiblen Reaktion gehörende polarographische Stufe kann im Polarogramm von 6-Methylpterin nicht auftreten. Somit wird die zweite Reduktionsstufe von Folsäure bzw. die erste der 7,8-Dihydro-

folsäure der Abspaltung zugeordnet (Abb. 12, vgl. Kurven a und f).

Der gesamte Reduktionsmechanismus in diesem pH-Bereich ist in Abbildung 13 wiedergegeben. Im ersten reduktiven

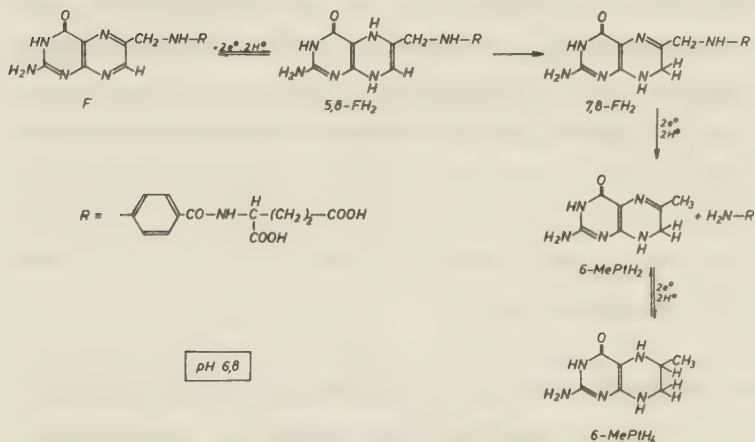


Abb. 13: Elektrochemische Reduktion von Folsäure bei pH 6,8.

F: Folsäure, FH₂: Dihydrofolsäure, 6-MePtH₂: 6-Methyldihydropterin, 6-MePtH₄: 6-Methyl-tetrahydropterin.

Zweielektronenschritt wird eine Dihydrofolsäure gebildet, welche mit Folsäure ein reversibles Redoxsystem darstellt. Es ist wahrscheinlich, daß es sich hierbei um die 5,8-Dihydrofolsäure handelt⁴⁴. Sie ist instabil und lagert sich in 7,8-Dihydrofolsäure um. Damit läßt sich die kinetische Begrenzung der zweiten Reduktionswelle von Folsäure deu-

ten. Die Stufe selbst wurde der reduktiven Seitenkettenabspaltung zwischen C-9 und N-10 zugeordnet. Das dabei entstehende 6-Methyl-7,8-dihydropterin wird in einen Zweielektronenschritt bei dem Potential der dritten Reduktionswelle von Folsäure weiterreduziert. Endprodukt der elektrochemischen Reduktion ist 6-Methyltetrahydropterin. Seine Oxidation führt über eine stufenweise Dehydrierung zu 6-Methylpterin (vgl. Zit. 13). Für das reversible System Folsäure/5,8-Dihydrofolsäure ergibt sich ein Redoxpotential von -509 mV gegen die Normalwasserstoffelektrode bei pH 7.

4.2.2 Reduktion bei pH 9

Bei pH 9 verschwindet die kinetische Stufe der Folsäure, da die für sie verantwortliche Reaktion zu langsam wird, und es bleibt nur die erste Stufe zurück. Wird unter diesen Bedingungen potentialkontrolliert im Grenzstrombereich dieser Stufe (ca. 50 mV negativer als das Halbwellenpotential) elektrolysiert, erhält man nur eine neue Reduktionsstufe, deren Halbwellenpotential gleich dem der 7,8-Dihydrofolsäure bei pH 9 ist. Eine Weiterreduktion bei -1500 mV führt zu einer Verbindung, deren Oxidationswelle ein Halbwellenpotential von -210 mV gegen die gesättigte Kalomelelektrode besitzt. Dies liegt im Bereich der Halbwellenpotentiale von Tetrahydropterin (6-Methyltetrahydropterin: $E_{1/2} = -200$ mV, 7-Methyltetrahydropterin: $E_{1/2} = -195$ mV, Tetrahydrofolsäure: $E_{1/2} = -210$ mV bei

pH 9 gegen die gesättigte Kalomelelektrode). Wird diese Substanz elektrolytisch bei pH 9 reoxidiert und das Reaktionsprodukt bei pH 6,8 polarographiert, so treten zwei Reduktionswellen auf, die fast mit denjenigen von 7,8-Dihydrofolsäure identisch sind. Ihre Halbwellenpotentiale stimmen überein, das Verhältnis der Stufenhöhen jedoch nicht. Bei pH 9 erscheint es somit möglich, aus Folsäure auf elektrolytischem Wege Tetrahydrofolsäure herzustellen. Die Reaktion verläuft aber nicht quantitativ. Als Nebenreaktion kann eine protonenkatalysierte Spaltung des ersten Oxidationsproduktes während der Reoxidation in Frage kommen. Auf dieses Problem wird bei der elektrochemischen Oxidation von Tetrahydrofolsäure näher eingegangen.

4.3 Potentialkontrollierte Oxidation von Tetrahydrofolsäure

4.3.1 Oxidation im pH-Bereich zwischen 5 und 7

Unter Verwendung der potentialkontrollierten Elektrolyse wurde die reversible erste Oxidationswelle von Tetrahydrofolsäure zwischen pH 5 und pH 7 untersucht. Die quantitative Oxidation im Grenzstrombereich verläuft unter der Abgabe von zwei Elektronen pro Molekül. Dabei wird nur eine einzige polarographische Reduktionswelle erhalten, deren Halbwellenpotential ca. 1000 mV negativer ist als das der ursprünglichen anodischen Stufe. Wird die elektrolytische Oxidation jedoch zeitlich verfolgt, und vergleicht man da-

bei der Abnahme der Stufenhöhe mit dem Ladungsumsatz, so ist der Quotient als Maß für den jeweiligen Elektronenumsatz nicht konstant. Anfangs sinkt die Oxidationsstufe proportional zu einem Einelektronenschritt und im weiteren Verlauf steigt die Anzahl der Elektronen pro Durchtrittsreaktion bis auf $n = 4$. Der Mittelwert $n = 2$ entspricht der Gesamtoxidation. Während der Elektrolyse wird außerdem das Halbwellenpotential der Oxidationsstufe positiver. Im U.V.-Spektrum beobachtet man eine hypsochrome Verschiebung der Bande von $\lambda_{\max} = 294 \text{ nm}$ nach $\lambda_{\max} = 275 \text{ nm}$. Dieses komplizierte Verhalten macht deutlich, daß die durch ihre Reduktionsstufe erkennbare Verbindung nicht das Primärprodukt der elektrolytischen Oxidation sein kann.

Es ist anzunehmen, daß sich zunächst Trihydrofolsäureradikale bilden (Abbildung 14). Der Elektrolyseverlauf deutet aber darauf hin, daß sie instabil sind und dimerisieren können. Aus diesem Grund ist es auch nicht möglich, eine Semichinonbildungskonstante (Gl. 13) anzugeben, wie es von ARCHER und SCRIMGEOUR⁸ allein aus polarographischen Daten versucht wurde. Die Struktur des Dimeren ist in Abbildung 14 nur schematisch wiedergegeben. Es können auch andere Verknüpfungen der beiden Radikale möglich sein. Eine Weiteroxidation ist nur dann zu erwarten, wenn a) ein Gleichgewicht zwischen den Dimeren und den Radikalen besteht, oder b) die Dimeren selbst oxidiert werden. Es entsteht aber in jedem Fall eine Dihydrofolsäure, die ein reversibles System mit Tetrahydrofolsäure darstellt. Diese Dihydrofolsäure ist wiederum nicht stabil und unterliegt einer

chemischen Reaktion, die zu einer Verbindung mit einer Reduktionsstufe bei wesentlich negativeren Potentialen führt. Das Reaktionsprodukt kann keine Dihydrofolsäure

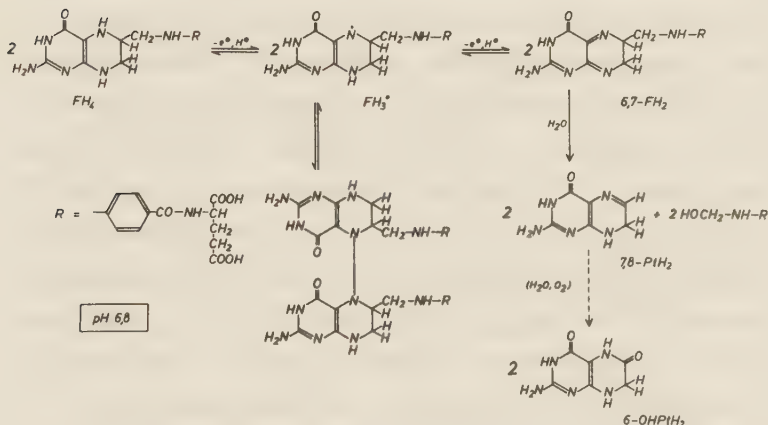


Abb. 14: Elektrochemische Oxidation von Tetrahydrofolsäure bei pH 6,8.

FH_2 : Dihydrofolsäure, FH_4 : Tetrahydrofolsäure, $\text{FH}_3^\bullet$: Trihydrofolsäureradikal, PtH_2 : Dihydropterin, 6-OHPtH₂: Dihydroxanthopterin.

sein: 7,8-Dihydrofolsäure besitzt in diesem pH-Bereich zwei Reduktionsstufen, 5,8-Dihydrofolsäure tautomerisiert zu 7,8-Dihydrofolsäure und die Existenz einer 5,6-Dihydrofolsäure ist noch zweifelhaft, wenn sie nicht an N-5 methyliert ist⁴⁴. Auch 6,7-Dihydrofolsäure ist auszuschliessen, da sie in ihrer o- oder p-chinoiden Form⁴⁵ als einzige Verbindung verbleibt, die mit Tetrahydrofolsäure ein reversibles Redoxsystem darstellen kann.

Wie bei der Reduktion von 7,8-Dihydrofolsäure muß die chemische Reaktion in einer Seitenkettenabspaltung bestehen. Der Mechanismus ist jedoch ein anderer. Es entsteht kein 6-Methyldihydropterin, da dieses bei noch negativeren Potentialen reduziert wird. Die Spaltung erfolgt außerdem ohne Durchtrittsreaktion, da nur ein oxidativer Zweielektronenschritt gefunden wurde. Es wird daher eine Reaktion unter der Mitwirkung von Wasser angenommen, wobei die Seitenkette zwischen C-6 und C-9 gelöst wird. Je nachdem, ob sich H- oder OH- in 6-Stellung anlagert, bildet sich Dihydropterin oder Dihydroxanthopterin (2-Amino-4,6-dihydroxy-7,8-dihydropterin). U.V.-spektroskopisch konnte letztere Verbindung identifiziert werden. Dabei ist aber nicht sicher, ob es sich hierbei um das wahre Reaktionsprodukt aus 6,7-Dihydrofolsäure handelt, da sich bei der Aufarbeitung der Luftsauerstoff nicht vollständig ausschließen ließ⁴⁶. Eine Verkleinerung des Moleküls bringt eine Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten mit sich, was sich in der Erhöhung der Reduktionsstufe nach der vollständigen Elektrolyse gegenüber der anfänglichen anodischen Stufe ausdrückt. Der vorgeschlagene Mechanismus ist in Abbildung 14 wiedergegeben. Für das Gleichgewicht Tetrahydrofolsäure/6,7-Dihydrofolsäure wird bei pH 7 ein Redoxpotential von +151 mV gegen die Normalwasserstoffelektrode gemessen.

4.3.2 Oxidation bei pH 9

Wird die Elektrolyse bei pH 9 durchgeführt, erhält man ein

Produkt, welches polarographisch bei pH 6,8 untersucht, zwei Reduktionsstufen aufweist. Ihre Halbwellenpotentiale entsprechen der 7,8-Dihydrofolsäure, nicht jedoch das Verhältnis der Stufenhöhen. Eine Weiterreaktion ist elek-

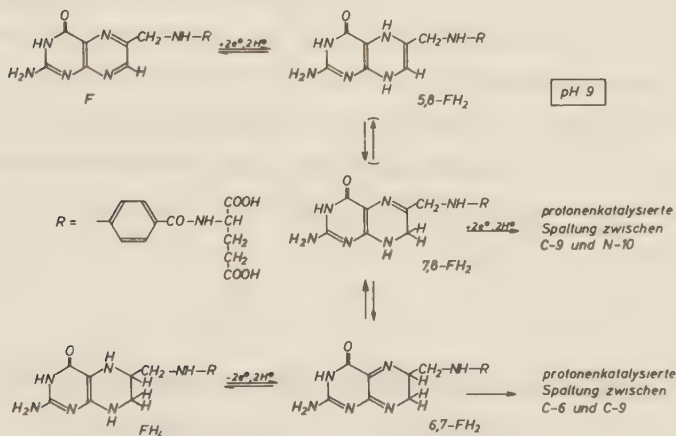


Abb. 15: Redoxmechanismus des Systems Folsäure - Dihydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure bei pH 9.

F: Folsäure, FH_2 : Dihydrofolsäure, FH_4 : Tetrahydrofolsäure.

trochemisch an der Quecksilberelektrode nicht möglich. Mit chemischen Agentien, z.B. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ oder Sauerstoff läßt sich die Oxidation jedoch bis zu den Ausgangspterinien fortführen⁴⁷. Bei Berücksichtigung der pH-Abhängigkeit der verschiedenen Reaktionswege gibt Abbildung 15 den gesamten Redoxmechanismus des Systems Folsäure - Di-

hydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure wieder. Dabei sind die Zwischenstufen während der Oxidation von Tetrahydrofolsäure nur teilweise aufgeführt. Unter der Voraussetzung, daß der Redoxmechanismus richtig ist, folgt, daß die zweite polarographische Reduktionsstufe von 7,8-Dihydrofolsäure (Abb. 10, Kurve 7,8-FH₂(r)₂) im sauren pH-Bereich der Reduktion von 6-Methyldihydropterin und im alkalischen Milieu der einer Dihydrofolsäure entsprechen muß. Eine Unterscheidung läßt sich mittels polarographischer Daten nicht treffen, da auch die zugehörigen Ausgangs- und Tetrahydroverbindungen in ihren Halbwellenpotentialen fast übereinstimmen.

4.4 Geschwindigkeitskonstanten der chemischen Folgereaktionen an Hand chronopotentiometrischer Messungen

Die bisherigen Ergebnisse aus den polarographischen und elektrolytischen Untersuchungen zeigen für die Reduktion von Folsäure einen ECEE-Mechanismus und für die Oxidation von Tetrahydrofolsäure einen EC-Mechanismus. Dabei steht "E" für einen Elektrodenprozeß und "C" für einen chemischen Vorgang ohne Durchtrittsreaktion. Im Fall der Oxidation von Tetrahydrofolsäure bezeichnet "E" einen elektrochemischen Vorgang in mehreren Schritten. An Stelle des EC-Mechanismus kann man daher dafür auch einen EEC-Mechanismus diskutieren. Um die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktionen zu messen, wurde die Chronopotentio-

metrie mit Stromumkehr herangezogen. Gleichzeitig ließ sich mit der Chronopotentiometrie der Reaktionsmechanismus nochmals überprüfen.

4.4.1 Reduktion von Folsäure

Bei der galvanostatischen Reduktion von Folsäure bestätigen die beobachteten Potential-Zeit-Kurven das polarographische Verhalten: Am hängenden Quecksilbertropfen wurden in 10^{-3} M Folsäurelösungen im sauren pH-Bereich (pH 4...7) drei reduktive Transitionszeiten erhalten, die den kathodischen polarographischen Stufen entsprechen. Verwendet man einen Doppelimpuls mit Stromumkehr, zeigt sich das reversible Verhalten der ersten Reduktionsstufe darin, daß die zu den beiden Stromimpulsen gehörenden Halbwellenpotentiale annähernd gleich sind. Die Halbwellenpotentiale liegen nach der Theorie für den ersten Impuls bei $\tau_1/4$, für den zweiten bei $0,222 \tau_2$ ⁵². Bei Stromstärken von 10^{-3} Acm^{-2} für beide Impulse ist das Verhältnis $t_1/\tau_2 = 1/3$. Dies entspricht der Theorie für einen einfachen Redoxprozeß ohne Folgereaktionen⁵². Eine Verkürzung der Transitionszeit τ_2 gemäß Gl. (16) infolge einer nachgelagerten Reaktion tritt erst bei Stromdichten im Bereich $< 10^{-4} \text{ Acm}^{-2}$ auf. Nachgelagerte Reaktion ist hier die langsame Tautomerisierung der 5,8-Dihydrofolsäure. Die pH-Abhängigkeit der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k dieser irreversiblen Folgereaktion ist aus Abbildung 16, Kurve a, zu entnehmen. Die eingetragenen Fehlerbalken haben eine Breite

von $\pm 10\%$. Mit steigendem pH-Wert erfolgt die Umwandlung langsamer. Dies ermöglichte, zu prüfen, ob das Zwischenprodukt 5,8-Dihydrofolsäure selbst direkt weiterreduzierbar ist. Das ist nicht der Fall, da man im pH-Bereich > 7 mit kathodischen Stromimpulsen von $10^{-4} \text{ A cm}^{-2}$ nur eine Transitionszeit erhält.

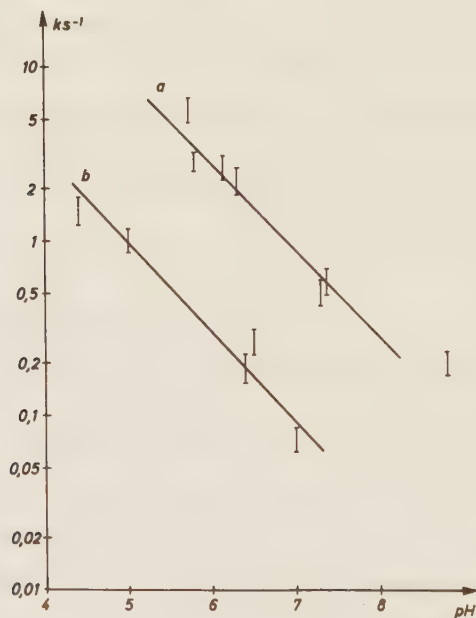
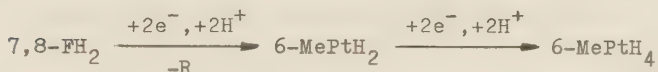


Abb. 16: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k vom pH-Wert für die irreversible Folgereaktion erster Ordnung der a) 5,8-Dihydrofolsäure und der b) 6,7-Dihydrofolsäure.

BRITTON-ROBINSON-Pufferlösung, $0,1 \text{ n KNO}_3$, 23°C .

4.4.2 Reduktion von 7,8-Dihydrofolsäure

Die Untersuchung der 7,8-Dihydrofolsäure (7,8-FH₂) mit dieser Methode ergab bei einfachen Einschaltvorgängen im pH-Bereich zwischen 4 und 7 zwei reduktive Transitionszeiten, wie es der Reaktion



entspricht (vgl. Abb. 7 und 13). Erfolgt eine Stromumkehr vor Ablauf der ersten Transitionszeit, tritt keine anodische Transitionszeit auf. Dies bestätigt die Irreversibilität des Abspaltungsprozesses und weiterhin die Tatsache, daß das entstehende 6-Methyldihydropterin (6-MePtH₂) elektrochemisch nicht mehr oxidiert werden kann. Wird erst im Bereich der zweiten Transitionszeit von Reduktion auf Oxidation umgeschaltet, tritt zwar eine anodische Transitionszeit auf, die Kurve ist jedoch nach positiveren Potentialen verschoben. Dies bestätigt die bereits mit der KALOUSEK-Methode gefundene Irreversibilität.

4.4.3 Oxidation von Tetrahydrofolsäure

Wird im pH-Bereich zwischen 4 und 7 mit Stromdichten von 10^{-3} Acm^{-2} während der anodischen Transitionszeit von Tetrahydrofolsäure eine Stromumkehr vorgenommen, resultiert eine reversible kathodische Transitionszeit. Bei kleine-

ren Stromdichten verkürzt sich wiederum die Transitionszeit τ_2 . Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten wurde eine irreversible Folgereaktion erster Ordnung angenommen und Gl. (18) benutzt. Die Geschwindigkeitskonstante ist bei gleichen pH-Werten kleiner als bei der Tautomerisierung von 5,8-Dihydrofolsäure. Sie wird einem Schritt der nachgelagerten Reaktion von 6,7-Dihydrofolsäure zugeordnet (Abb. 14). In Abbildung 16, Kurve b, ist die pH-Abhängigkeit der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aufgetragen. Wie bei der Tautomerisierung der 5,8-Dihydrofolsäure ist die Steigung $\text{dlgk/dpH} = -0,5$. Dies entspricht einer Protonenkatalyse der Reaktionen. Für die Abhängigkeit mit $\sqrt{c_{\text{H}^+}}$ konnte noch keine sichere Deutung gefunden werden. Eindeutige Rückschlüsse auf den Elementarprozeß sind schon deshalb erschwert, da die Konzentration und die Art des verwendeten Puffers die Geschwindigkeitskonstante beeinflussen⁴⁸.

4.5 Orientierende Versuche zur Komplexbildung

Bei der biochemischen oxidativen Hydroxylierung von Phenylalanin ist neben der Mitwirkung eines Tetrahydropterins die Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen von Bedeutung. Diese können im Modellsystem entweder enzymgebunden^{10,49} oder als Komplex mit dem Coenzym⁵⁰ an der Umsetzung beteiligt sein. Ein Modellcoenzym mit geringer biochemischer Aktivität ist die Tetrahydrofolsäure. Ihre Tendenz, Komplexe mit Ni^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ und Hg^{2+} zu bilden, wurde polaro-

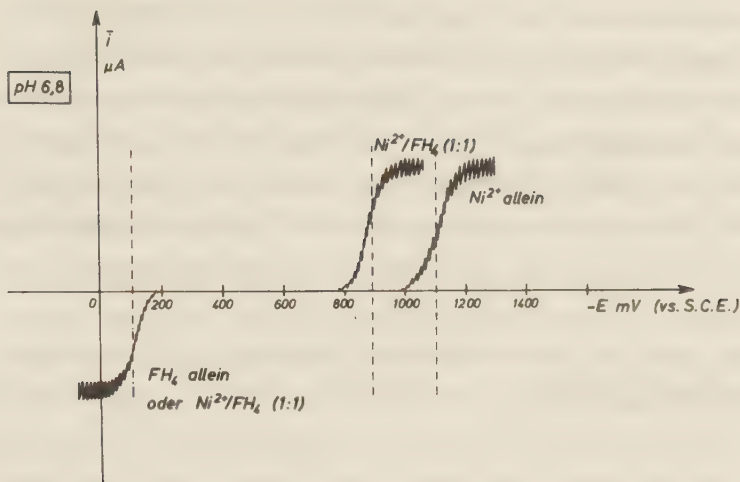


Abb. 17: Polarogramme von Tetrahydrofolsäure (FH_4), Nickelionen (Ni^{2+}) und Lösungen von Nickelionen und Tetrahydrofolsäure im Konzentrationsverhältnis 1:1 ($\text{Ni}^{2+}/\text{FH}_4$ 1:1) in BRITTON-ROBINSON-Puffer bei pH 6,8, 0,1 n KNO_3 , 25°C. Abszisse: Potential gegen die gesättigte Kalomelelektrode, Ordinate: kathodischer Strom.

graphisch in BRITTON-ROBINSON-Pufferlösungen bei pH 6,8 untersucht⁵¹. Silber- und Quecksilberionen oxidieren die Tetrahydrofolsäure und wirken somit nicht als Komplexbildner. Mit Cu^{2+} -ionen wurde eine rötlichbraune Fällung beobachtet. Hierbei bildet sich entweder ein schwerlösliches Salz oder ein Komplex. Von besonderem Interesse ist das Verhalten von Eisen- und Nickelionen. Fe^{3+} -ionen zeigen keine eigene polarographische Stufe und beeinflussen auch die der Tetrahydrofolsäure nicht. Dagegen addieren sich die Oxidationsstufen von Fe^{2+} -ionen und Tetrahydro-

folsäure konzentrationsproportional zu einer Welle beim Halbstufenpotential der Tetrahydrofolsäure. Mit dieser Oxidationshemmung der Fe^{2+} -Ionen läßt sich nur eine schwache Wechselwirkung zwischen den Reaktionspartnern annehmen. Bei Anwesenheit von Nickelionen ändert sich die Tetrahydrofolsäurestufe nicht. Die Ni^{2+} -Reduktionsstufe verschiebt sich jedoch bei einem Überschuß an Tetrahydrofolsäure um 250 mV in positiver Richtung und wird reversibler (Abb. 17). Hier liegt wahrscheinlich eine echte Komplexbildung vor.

5. Zusammenfassung

Das System Folsäure - Dihydrofolsäure - Tetrahydrofolsäure wurde mittels Polarographie, potentialkontrollierter Elektrolyse und Chronopotentiometrie mit Stromumkehr elektrochemisch untersucht und die Oxidations- und Reduktionsmechanismen der einzelnen Verbindungen aufgeklärt.

Zwischen pH 5 und pH 7 läßt sich Folsäure reversibel in einem Zweielektronenschritt zu 5,8-Dihydrofolsäure reduzieren. Die Anzahl der Elektronen pro Durchtrittsreaktion n folgt aus der unabhängigen Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Folsäure ($D = (3,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$). Für das System Folsäure/5,8-Dihydrofolsäure wurde ein Redoxpotential von -509 mV gegen die Normalwasserstoffelektrode bei pH 7 gemessen. 5,8-Dihydrofolsäure ist jedoch instabil und unterliegt einer protonenkatalysierten Umlagerung

zu 7,8-Dihydrofolsäure. Diese spaltet die Seitenkette zwischen C-9 und N-10 unter Aufnahme von zwei Elektronen ab. Das entstehende 6-Methyl-7,8-dihydropterin wird in einem nochmaligen Zweielektronenschritt zu 6-Methyltetrahydropterin weiterreduziert. Die gesamte Reduktion stellt einen ECEE-Mechanismus dar und ist mit einem Verbrauch von sechs Wasserstoffionen verbunden.

Bei pH 9 läßt sich Folsäure elektrochemisch über einen EE-Mechanismus zu Tetrahydrofolsäure reduzieren. Dieser kathodische Zweistufenprozeß verläuft ohne Seitenkettenabspaltung. Die Oxidation von Tetrahydrofolsäure ist unter diesen Bedingungen (pH 9) aber nur bis zur 7,8-Dihydrofolsäure möglich.

Zwischen pH 5 und pH 7 wird Tetrahydrofolsäure in einem reversiblen Zweielektronenschritt zu 6,7-Dihydrofolsäure oxidiert. Eine genaue Analyse der Strom-Spannungs-Kurve dieser Durchtrittsreaktion zeigt, daß es sich hierbei um zwei aufeinanderfolgende Eielektronenprozesse handelt. Es bilden sich intermediär Trihydrofolsäureradikale, welche dimerisieren können. Alle auftretenden Verbindungen stehen in reversiblen Gleichgewichten miteinander. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt dabei so schnell, daß das erste relativ stabile Oxidationsprodukt dieser Reaktion, die chinoide 6,7-Dihydrofolsäure, mit Tetrahydrofolsäure ein Redoxsystem darstellt. Das Redoxpotential wurde bei pH 7 zu +151 mV gegen die Normalwasserstoffelektrode bestimmt. Die so entstandene 6,7-Dihydrofolsäure unter-

liegt einer irreversiblen Folgereaktion, wobei die Seitenkette zwischen C-6 und C-9 ohne Reaktion über die Elektrode abgespalten wird. Die entstehende Dihydroverbindung, Dihydropterin oder Dihydroxanthopterin, ist elektrochemisch nicht weiter oxidierbar. Somit entspricht die Oxidation von Tetrahydrofolsäure in diesem pH-Bereich einem EC- bzw. EEC-Mechanismus.

Die Geschwindigkeitskonstanten der irreversiblen nachgelagerten Reaktionen von 5,8-Dihydrofolsäure und 6,7-Dihydrofolsäure wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt und ferner einige orientierende Versuche zur Elektrochemie von Komplexen der Tetrahydrofolsäure mit Fe^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen mitgeteilt.

Literatur

- 1.) L. JAENICKE, *Angew. Chem.*, 73, 449 (1961).
- 2.) S. KAUFMAN, *J. Biol. Chem.*, 234, 2672 (1959).
- 3.) S. KAUFMAN, B. LEVENBERG, *J. Biol. Chem.*, 234, 2683 (1959).
- 4.) J. KOMENDA, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 24, 903 (1959).
- 5.) J. KOMENDA, L. KISOVA, J. KOUDELKA, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 25, 1020 (1960).
- 6.) J. KOMENDA, D. LASKAFELD, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 27, 199 (1961).
- 7.) M. BREZINA, P. ZUMAN, *Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie*, Geest und Portig KG., Leipzig 1956, 364 (1956).
- 8.) M.C. ARCHER, K.G. SCRIMGEOUR, *Canad. J. Biochem.*, 48, 526 (1970).
- 9.) S. KAUFMAN, *J. Biol. Chem.*, 336, 804 (1961).
- 10.) L. JAENICKE, A.W. WAHLEFELD, *FEBS Symposium*, 16, 249 (1969).
- 11.) A. EHRENBURG, P. HEMMERICH, F. MÜLLER, T. OKADA und M. VISCONTINI, *Helv. Chim. Acta*, 50, 411 (1967).
- 12.) S. KAUFMAN, G.B. STORM, D.B. FISCHER, *Chemistry and Biology of Pteridines*, Ed. by K. Iwai, M. Akino, M. Goto, Y. Iwanami, International Academic Printing Co, Ltd. Tokyo, 1970, 208 (1970).
- 13.) Y. ASAHI, *Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol., Biol., Part I*, 74, (1964).
- 14.) D. ILKOVIC, *J. chim. physique*, 35, 129 (1938).
- 15.) W.H. REINMUTH, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 6358 (1957).
- 16.) R. BRDICKA, *Grundlagen der phys. Chemie*, 5. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1965, 702 (1965).
- 17.) R. BRDICKA, *Z. Elektrochem.*, 48, 278 (1942).
- 18.) K. VESELY, R. BRDICKA, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 12, 313 (1947).
- 19.) J. HEYROVSKY, J. KUTA, *Grundlagen der Polarographie*, Akademie-Verlag, Berlin 1965, 186 (1965).
- 20.) R. BRDICKA, *Z. Elektrochem.*, 47, 314 (1941).
- 21.) M. KALOUSEK, M. RALEK, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 19, 1099 (1954).

- 22.) F. BECK, L. EBERSON, A. WEISSBERGER, B.W. ROSSITER, Physical Methods of Chemistry, Vol. I, Part II A., Electrochemical Methods, Wiley-Interscience, J. Wiley and Son, Inc., New York, London, Sydney, Toronto, 1971, 645 (1971).
- 23.) W. JAENICKE, H. HOFFMANN, Z. Elektrochem., 66, 803 (1962), 66, 814 (1962).
- 24.) A.C. TESTA, W.H. REINMUTH, Analyt. Chem., 32, 1519 (1960).
- 25.) O. FISCHER, L. KISOVA, J. STEPANEK, J. electroanalyt. chem., 17, 233 (1968).
- 26.) K. KRETZSCHMAR, W. JAENICKE, Tetrahedron Letters, 43, 3811, (1969).
- 27.) O. DRACKA, Coll. Czechoslov. Chem. Commun., 32, 3987 (1967).
- 28.) JAHNKE-EMKE-LÖSCH, Tafeln höherer Funktionen, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 6. Auflage, 1960, 31 (1960).
- 29.) C.L. RULFS, J. Am. Chem. Soc., 76, 2071 (1954).
- 30.) R.L. BLAKLEY, Nature, 188, 231 (1960).
- 31.) L. JAENICKE, priv. Mitteilung.
- 32.) M. VISCONTINI, A. BOBST, Helv. Chim. Acta, 49, 875 (1966).
- 33.) ORGANIKUM, organisches Grundpraktikum, 3. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1964, 258 (1964).
- 34.) H.T.S. BRITTON, R.A. ROBINSON, J. Chem. Soc., (London) 1931, 1456 (1931).
- 35.) F. MÖLLERS, Dissertation, Erlangen-Nürnberg, 1967.
- 36.) W.H. REINMUTH, Analyt. Chem., 33, 322 (1961).
- 37.) K. KRETZSCHMAR, W. JAENICKE, Z. Naturforsch., 26 b, 225 (1971).
- 38.) L. JAENICKE, J. STAHL, priv. Mitteilung.
- 39.) K. KRETZSCHMAR, W. JAENICKE, Z. Naturforsch., 26 b, 999, (1971).
- 40.) L.F. CAVALIERI, B.A. LOWY, Arch. Biochem. Biophys., 35, 83 (1952).
- 41.) D.L. SMITH, P.J. ELVING, J. Am. Chem. Soc., 84, 2741 (1961).
- 42.) W. PFLEIDERER, Angew. Chem., 75, 993 (1963).
- 43.) E. LIPPERT, H. PRIGGE, Ber. Bunsenges. phys. Chem., 64, 662 (1960).
- 44.) A. EHRENBERG, P. HEMMERICH, F. MÜLLER, W. PFLEIDERER, Europ. J. Biochem., 16, 581 (1970).

- 45.) A. BOBST, *Helv. Chim. Acta*, 50, 1840 (1967).
- 46.) H. REMBOLD, H. METZGER, W. GUTENSOHN, *Biochim. Biophysica Acta*, 230, 117 (1970).
- 47.) D. CHIPPEL, K.G. SCRIMGEOUR, *Canad. J. Biochem.*, 48, 999 (1970).
- 48.) M.C. ARCHER, K.G. SCRIMGEOUR, *Canad. J. Biochem.*, 48, 278 (1970).
- 49.) A.W. WAHLEFELD, L. JAENICKE, G. HEIN, *Liebigs Ann. Chem.*, 715, 52 (1968).
- 50.) M. VISCONTINI, *Angew. Chem.*, 80, 492 (1968).
- 51.) K. KRETZSCHMAR, W. JAENICKE, *Experienta Suppl.*, 18, 375 (1971).
- 52.) P. DELAHAY, *New Instrumental Methods in Electrochemistry*, Interscience Publ., Inc., New York, London 1954, Chap. 8 (1954).

A n h a n g

A 1. Apparatur zur Polarographie und potentialkontrollierten Elektrolyse

Der Schaltplan der elektronischen Apparatur für die polarographischen Messungen und die potentialkontrollierte Elektrolyse sind aus Abbildung A-1 zu entnehmen.

Schaltplan Polarograph

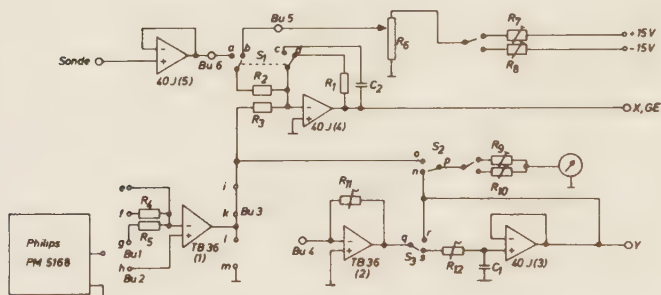


Abb. A-1: Schaltplan der Meßapparatur für die Polarographie und die potentialkontrollierte Elektrolyse.

Bauteilliste

operative Verstärker:

TB 36 (1) und TB 36 (2) (tranchant électronique s. a., München) mit Trimpmpotentiometer 50 K, 40 J (3), 40 J (4), 40 J (5) (Analog Devices, München) mit Trimpmpotentiometer 1 K.

Funktionsgenerator:

PM 5168 Philips, Frequenzbereich 0,5 mHz ... 5 KHz.

Widerstände:

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 : 100 K

R_6 (Digikombipot): 1 K

R_7, R_8, R_9, R_{10} (Trimpmpotentiometer): 25 K

R_{11} (Meßwiderstände): 100, 1 K, 10 K, 100 K, 1 M, 10 M

R_{12} (Dämpfungswiderstände): 100 K, 150 K, 220 K, 330 K,
470 K, 820 K, 1 M.

Kondensatoren:

C_1 10 μ F, C_2 470 pF

Schalter:

S 1, a-c: Potentiostat ein

S 1, b-d: Nullpunktsunterdrückung ein

S 2, o-p: Potentialmessung

S 2, n-p: Strommessung

S 3, q-r: Dämpfung aus

S 3, q-s: Dämpfung ein

Buchsen:

Bu 1: Signaleingang mit Phasenumkehr an TB 36 (1),
gleichzeitig Kurzschlußbügel über die Buchsen
f-k und h-m.

Bu 2: Signaleingang ohne Phasenumkehr an TB 36 (1),
gleichzeitig Kurzschlußbügel über die Buchsen
e-i.

Bu 3: Ausgang TB 36 (1)

Bu 4: Eingang Meßverstärker TB 36 (2)

Bu 5: Meßspannung von R_6 (gegen Masse)

Bu 6: Ausgang operativer Verstärker 40 J (5)

Bu Sonde: Eingang Sonde

Bu X: Schreibereingang X

Bu Y: Schreibereingang Y

Bu X, GE: Gegenelektrode bei potentiostatischer Messung

Meßanordnung für potentialkontrollierte Elektrolyse

Bu 4: Quecksilbersee

Bu X, GE: Platingegenelektrode

Bu Sonde: gesättigte Kalomelelektrode

Bu Y: Schreiber, Y Eingang

PM 5168: konstante Spannung an Bu 2, Kurzschlußstecker
e-i, S 1: Potentiostat ein

Meßanordnung Polarographie

- Bu 3: Quecksilbertropfelektrode
- Bu 4: gesättigte Kalomelelektrode (Gegen- und Vergleichs-
elektrode)
- Bu X, Bu Y: X-Y/YT-Schreiber (Servogor Typ RE 551, Me-
trawatt AG, Nürnberg)
- PM 5168: Dreiecksspannung an Bu 2, Kurzschlußstecker
e-i
- S 1: Potentiostat aus

Aus der Schaltung ist ersichtlich, daß der operative Verstärker TB 36 (1) nur unvollständig verdrahtet ist. Die offenen Kreise e-m in der Abbildung A-1 stellen von außen zugängliche Buchsen dar, welche durch Kurzschlußbügel überbrückt werden können (genaue Beschreibung siehe Bauteilliste unter "Buchsen"). Damit ist es möglich, das Eingangssignal wahlweise in seiner Phase zu drehen. TB 36 (1) dient der Entkopplung vom Funktionsgenerator PM 5168 und hat einen Verstärkungsgrad + 1 oder - 1. Das Eingangssignal wird vom Funktionsgenerator geliefert und ist in Frequenz, Amplitude und Nullpunkt veränderlich. Da die Signale nicht belastbar sind, wurden sie meist an den hochohmigen Eingang (+ Eingang: 1,3M) von TB 36 (1) gelegt.

A 1.1 Verwendung der Apparatur zur potentialkontrollierten Elektrolyse

Das konstante Elektrolysepotential wird dem Funktionsgenerator entnommen. Es liegt durch TB 36 (1) entkoppelt und in seiner Phase um 180° gedreht (40 J (4)) an der Gegen-

elektrode. Mit der Sonde wird das Potential der Lösung vor der Arbeitselektrode gemessen. Bei der Schalterstellung S 1, a-c, entkoppelt der operative Verstärker 40 J (5) die Sonde auf Grund seines hohen Widerstandes von 10^{11} Ohm am positiven Eingang. Ohne Phasenumkehr gelangt das Spannungssignal über R_2 auf den Summenverstärker 40 J (4). Das über R_3 kommende Signal besitzt entgegengesetztes Vorzeichen und die Spannungsdifferenz wird 10^5 -fach verstärkt. Diese Anordnung bewirkt, daß sich am Eingang des operativen Verstärkers 40 J (4) eine Spannung einstellt, die mit dem Verstärkungsgrad von 10^5 das vorgewählte Potential erreicht. Die Potentialdifferenz zwischen Gegenelektrode und Sonde beträgt dann einige Mikrovolt. Dieser Zustand stellt sich im Mikrosekundenbereich ein und wird auf diese Weise dauernd kontrolliert. Der integrierte Schaltkreis kann dadurch zu unerwünschten hochfrequenten Schwingungen angestoßen werden. Sie werden durch den Kondensator C_2 unterbunden. Über Buchse 4 liegt die Arbeitselektrode an der virtuellen Erde. Der operative Verstärker TB 36 (2) mit den Meßwiderständen R_{11} dient der Strommessung. Der Strom kann am Meßinstrument abgelesen werden, wenn der Schalter S 2 in Stellung n-p und der Schalter S 3 in Stellung q-r stehen. Das Elektrolysepotential erscheint bei der Schalterstellung S 2, o-p, auf dem Anzeigeinstrument. Zur Aufzeichnung der Strom-Zeit-Kurven diente der X-Y/YT-Schreiber Servogor Typ RE 551 (Metrawatt AG, Nürnberg).

A 1.2 Verwendung der Apparatur zur Polarographie

Zu den polarographischen Messungen wird der Potentiostat durch den Schalter S 1 in Stellung b-d ausgeschaltet. Der Funktionsgenerator liefert in diesem Fall eine Dreiecksspannung. Das Signal gelangt ohne Phasenumkehr an Buchse 3, die mit der Quecksilbertropfelektrode verbunden ist. Mit dem Meßverstärker TB 36 (2) und R_{11} erfolgt wiederum die Strommessung. Zur Dämpfung der polarographischen Momentanströme wird ein Dämpfungsglied nachgeschaltet (R_{12} und C_1). Es wird durch 40 J (3) entkoppelt und über Buchse Y an den Y-Eingang des Schreibers gelegt. Der X-Eingang des Schreibers liegt an Buchse X. Wie bei der Elektrolyse können Strom und Spannung bei Betätigung von Schalter S 2 am Meßinstrument abgelesen werden. Reicht die Schreiberbreite zur Aufnahme des Polarogramms nicht aus, kann die Nullpunktsunterdrückung verwendet werden. Mittels eines Zehnwendelpotentiometers R_6 läßt sich der Nullpunkt des Schreibers auf der Potentialachse kontinuierlich um ± 2 V verschieben.

A. 2 Apparatur zur Chronopotentiometrie mit Stromumkehr

Das Fließschema in Abbildung A-2 gibt die Versuchsanordnung wieder. Mit dem Startschalter S wird ein Nadelimpuls erzeugt, welcher sowohl den ersten Impulsgenerator G 1 wie auch den Oscillographen (Tektronix Storage Oscilloscope, Typ 564, Portland, Oregon, USA) anstößt. Die Rück-

flanken der erzeugten Impulse triggern ihrerseits immer den nächstfolgenden Generator. G 1 enthält keinen Stromschalter. Er liefert nur den Anfangspunkt der Potential-Zeit-Kurve, G 2 und G 3 stellen die eigentlichen Generatoren für galvanostatische anodische oder kathodische Impul-

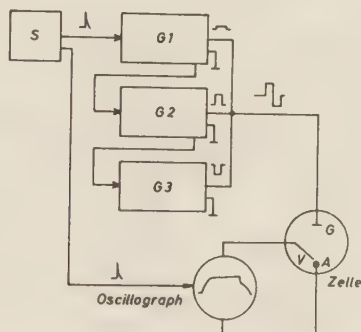


Abb. A-2: Fließschema der Versuchsanordnung bei Chronopotentiometrie mit Stromumkehr.

se dar. Sie können wahlweise so geschaltet werden, daß der erste Impuls sowohl einen anodischen als auch einen kathodischen Strom liefert. Das in dieser Weise vorgewählte Programm wird auf die Gegenelektrode G gegeben. Die polarisierbare Arbeitselektrode A liegt an Masse. Die Messung des Potentials vor der Arbeitselektrode erfolgt mittels eines Oscillographen oder eines XY-Schreibers. Dazu dient eine gesättigte Kalomelelektrode als Vergleichselektrode V. Abbildung A-3 stellt den Bauplan des anodischen Kanals dar. Startschalter ist ein bistabiler Multivibra-

tor. Dieser stößt einen monostabilen Multivibrator an, der einen zeitlich veränderlichen Impuls liefert. Es können Impulslängen bis 20 sec entnommen werden. Diesem Impuls wird nach Negation, Entkopplung und nochmaliger Negation ein Strom eingeprägt. Dabei ist gewährleistet, daß

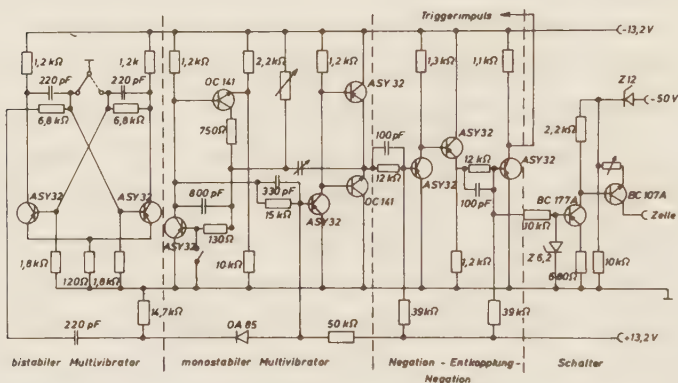


Abb. A-3: Schaltplan des anodischen Impulsgenerators.

der Strom auch bei hohem Zellenwiderstand konstant bleibt. Die Rückflanke dieses Impulses triggert den kathodischen Kanal. Dieser hat einen identischen Schaltplan. Hierbei sind nur alle p-n-p Transistoren gegen n-p-n Transistoren und umgekehrt auszutauschen. Da dieser Generator einen entgegengesetzten Impuls liefert, muß der Triggerimpuls schon nach der ersten Negation entnommen werden. Den Aufbau der elektrolytischen Zelle für die Chronopotentiometrie mit Stromumkehr kann man Abbildung A-4 entnehmen. Sie besteht aus einem thermostatierbaren Mantel 8, welcher seitlich eine Normschliffhülse zur Aufnahme der LUGGIN-Kapillare 9

enthält. Über eine KNO_3 -Brücke ist sie mit der gesättigten Kalomelelektrode 10 verbunden. Die Arbeitselektrode 4 stellt einen hängenden Quecksilbertropfen dar, der mittels eines Tropfengebers reproduzierbar erzeugt wird. Dabei

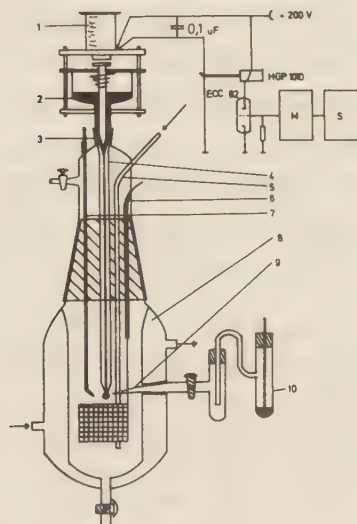


Abb. A-4: Die elektrolytische Zelle.

S Startschalter, M monostabiler Multivibrator, 1 Magnetspule, 2 Quecksilbervorrat, 3 Ventil, 4 Kapillare, 5 Stickstoffzufuhr, 6 Gegenelektrode, 7 Vorrichtung zum Abschlagen des Quecksilbertropfens, 8 Zellenmantel, 9 LUGGIN-Kapillare, 10 gesättigte Kalomелеlektrode.

wird die Magnetspule 1 über ein Quecksilberrelais (Mercury wetted contact Relay, Type HGP 1010, C.P. Clare and

Co, Chicago) eingeschaltet. Diese erhält einen regelbaren Impuls von einem monostabilen Multivibrator M, der durch einen Startschalter S getriggert wird. Auf diese Weise wird das Ventil 3 geöffnet. Das Quecksilber fließt aus einem Vorratsgefäß 2 in die siliconisierte Kapillare 4 und bildet an ihrem unteren Ende einen Tropfen aus. Seine Haftung wird dadurch gesichert, daß der Anker des Magnetventils gegen die Magnetspule 1 verkantet ist und somit ein hartes Anschlagen der Weicheisenplatte bei Ventilöffnung verhindert wird. Nach jeder Messung wird der Quecksilbertropfen mittels 7 abgeschlagen. Die Gegenelektrode ist mit 6 und die Stickstoffzufuhr mit 5 bezeichnet. Ein einwandfreies Funktionieren der Arbeitselektrode ist nur dann gewährleistet, wenn sie nach sorgfältiger Reinigung und Siliconisierung von unten mit entgastem Quecksilber gefüllt wird, um die Ausbildung einer Luftblase an der Metallspitze des Magnetventils zu vermeiden.

A 3. Schaltbild und Arbeitsweise des KALOUSEK-Umschalters

Die Arbeitsweise des KALOUSEK-Umschalters ist aus Abbildung A-5 ersichtlich. Mit Hilfe der elektronisch gesteuerten Relaispule (siehe Abb. A-6) wird ein Umschalter U betätigt, der abwechselnd das Hilfspotential und die polarographische Dreiecksspannung P in den Stromkreis der Meßzelle Z schaltet. Das konstante Hilfspotential wird einer regelbaren Spannungsquelle entnommen. Im Meßkreis (Abb. A-5, P-Z-U) erfolgt die Registrierung der umgeschalteten Kurven mit einem Galvanometer (bzw. X-Y/YT-Schreiber).

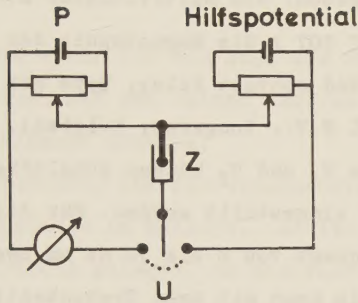


Abb. A- 5: Blockschaltbild zur Arbeitsweise des KALOUSEK-Umschalters

P Polarograph, Z Meßzelle, U Umschalter

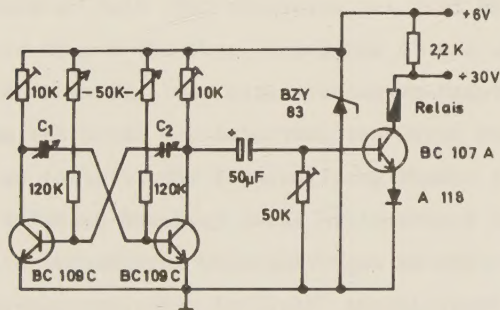


Abb. A-6: Schaltbild des KALOUSEK-Umschalters

BZY 83: Zenerdiode 6 V (stabilisiert die Betriebsspannung), A 118: Diode (sperrt BC 107 A bei zu kleinen Aussteuerungsspannungen), Relais: Relaisspule für den Umschalter U in Abb. A-5,

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990